

# **Chemo-enzymatische asymmetrische Synthesen mit DHAP-Aldolasen**

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

eingereicht von

Diplom-Chemikerin Nga Phung  
aus Fontenay-aux-Roses (Frankreich)

Berichterstatter : Universitätsprofessor Dr. W.-D. Fessner  
Mitberichterstatter : Universitätsprofessor Dr. H. J. Lindner  
Tag der Einreichung : 05. 12. 2003  
Tag der mündlichen Prüfung : 02.02.2004

Darmstadt 2004

Herrn Prof. W.-D. Fessner danke ich herzlich für die reizvolle, vielseitige Themenstellung und den großzügig gewährten Freiraum bei der Ausgestaltung dieser Arbeit. Zahlreiche Anregungen und Diskussionen haben sehr zum Gelingen beigetragen.

Herrn Prof. H. J. Lindner danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Folgenden Damen und Herren möchte ich für die wertvolle Unterstützung herzlich danken.

- „Un très grand merci à“ allen ehemaligen und allen aktuellen Kolleginnen und Kollegen aus Aachen und Darmstadt für die gute Zusammenarbeit und für die nette Stimmung;
- Den Angestellten der Service Abteilungen des Instituts für Organische Chemie der RWTH Aachen und der TU Darmstadt für ihre Hilfsbereitschaft;
- Allen Freunden von mir für ihre liebe Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Enzyme als „pfiffige“ Werkzeuge für den organischen Chemiker	2
1.1.1.	Verfügbarkeit der Enzyme	3
1.1.2.	Mechanistische Aspekte der Enzymspezifität	4
1.2.	DHAP-abhängige Aldolasen	5
1.3.	Die enzymatische Aldolreaktion	10
1.3.1.	Prinzip der Tandem-Aldoladdition	12
1.3.2.	Spirozucker	17
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>Glycerinaldehyd-Äquivalente durch Lipasen-katalysierte Racematspaltung</b>	<b>21</b>
3.1.	Lipasen	22
3.1.1.	Lipasen	23
3.1.2.	Der Katalyse-Mechanismus der Lipasen	24
3.1.3.	Lipasen in organischen Lösungsmitteln	25
3.2.	Enzymatische Racematspaltung	26
3.2.1.	Kinetik und Spezifität	27
3.2.2.	Enantioselektivitätsprognosen	29
3.3.	1,2-Diole durch enantioselektive Hydrolyse cyclischer Carbonate	30
3.3.1.	Anwendungen	30
3.3.2.	Mechanismus der enzymatischen Hydrolyse von cyclischen Carbonaten	32
3.3.3.	Enzymatische Racematspaltung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol	33
3.3.4.	Enzymatische Racematspaltung von 4-Phenyl-3-buten-1,2-diol	33
3.4.	Enzymatische Diskriminierung von 3-Buten-1,2-diol	35
3.4.1.	Racematspaltung durch Umesterung	35

3.4.2.	Anwendungen	36
3.4.3.	Racematspaltung von 1-Trityloxy-3-buten-2-ol	39
3.5.	Zusammenfassung	42
<b>4.</b>	<b>Tandem – Aldoladdition</b>	<b>44</b>
4.1.	Synthese von <i>Spiro</i> -Saccharidmimetika mit Norbornangerüst	45
4.1.1.	Modellstudie : Chemo-enzymatische “Spiroglycosylierung” aus Norcampher	45
4.1.2.	Chemo-enzymatische Tandem-Aldoladdition mit dem C <sub>2</sub> -symmetrischen Norbornan-2,5-dion	47
4.2.	Synthese von <i>Spiro</i> -Saccharidmimetika aus Bicyclo[3.3.0]octan-3,7-dion	48
4.3.	Synthese von aromatischen <i>Spiro</i> -Saccharidmimetika	50
4.3.1.	Tandem-Aldoladdition aus 1,3-Indandion	50
4.3.2.	Aldoladdition aus 2-Indanon	51
4.4.	Zusammenfassung	55
<b>5.</b>	<b>Ringschlussmetathese mit Substraten, die freien Hydroxyl-gruppen enthalten</b>	<b>59</b>
5.1.	Die Metathesereaktion	59
5.1.1.	Die Katalysatoren	61
5.1.2.	Der Mechanismus der Metathesereaktion	63
5.2.	Ringschlussmetathese mit aromatischen Substraten	65
5.2.1.	Synthese von 1-Indenol durch RCM	65
5.2.2.	Synthese von 1,2-Dihydronaphthol	67
5.3.	Ringschlussmetathese-Reaktionen mit aliphatischen Substraten	69
5.3.1.	Synthese von <i>cis</i> -4-Cyclohexen-1,2-diol	69
5.3.2.	Synthese von <i>cis</i> -Bicyclo[4.4.0]dec-3-en-1,6-diol	70
5.4.	Zusammenfassung	71

<b>6.</b>	<b>Analoga von Pancratistatin</b>	<b>72</b>
6.1.	Die <i>Amaryllidaceae</i> -Alkaloide	72
6.2.	Pancratistatin	74
6.2.1.	Struktur des Pancratistatins	74
6.2.2.	Biologische Wirkung	74
6.2.3.	Synthese von Pancratistatin	76
6.3.	Synthese von Pancratistatin-Analoga	76
6.4.	Zusammenfassung	81
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>90</b>
<b>9.</b>	<b>Literatur</b>	<b>135</b>

## **Anhang**

## Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
AllBr	Allylbromid
Bn	Benzyl-Rest
Bz	Benzoyl-Rest
Cat	Katalase (Ec. 1.11.1.6)
CHA	Cyclohexylammonium
DC	Dünnschichtchromatographie
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBP	D-Fructose-1,6-bisphosphat
Fru-6-P	D-Fructose-6-phosphat
FruA	D-Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (EC 4.1.2.13)
FruArab	FruA aus Kaninchenmuskel
FruAsca	FruA aus <i>S. Carnosus</i>
FruA*	Reaktionssequenz: Ozonolyse, FruA-Aldoladdition, Dephosphorylierung
FucA	L-Fuculose-1-phosphat-Aldolase (EC 4.1.2.17)
FucA*	Reaktionssequenz: Ozonolyse, FucA-Aldoladdition, Dephosphorylierung
G3P	L-, sn-Glycerin-3-phosphat
G6P-DH	D-glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GPO	L-, sn-Glycerin-3-phosphat-Oxidase
IPTG	Isopropylthiogalactosid
NAD <sup>+</sup>	β-Nicotinaminadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	β-Nicotinaminadenindinucleotid (reduzierte Form)
Pase	alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)
PLE	Esterase aus Schweineleber (EC 3.1.1.1)
PPL	Lipase aus Schweinepankreas (EC 3.1.1.3)
RhuA	L-Rhamnulose-1-phosphat-Aldolase (EC 4.1.2.19)
RhuA*	Reaktionssequenz: Ozonolyse, RhuA-Aldoladdition, Dephosphorylierung
RT	Raumtemperatur

SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
TagA	D-Tagatose-1,6-bisphosphat-Aldolase (EC 4.1.2.-)
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl-Rest
TPI	Triosephosphatisomerase (EC 5.3.1.1)
Tr	Trityl-Rest
ÜZ	Übergangszustand

## 1. Einleitung

Enzyme spielen eine fundamentale Rolle in der Chemie des Lebens. Als Proteine sind sie allgegenwärtig und wirken bei biochemischen Prozessen als chirale Katalysatoren.

Bereits in der Antike wurden Enzyme bei der Herstellung von Lebensmitteln verwendet, z.B. bei der Fermentation von Wein, bei der Säuerung von Brot, beim Bierbrauen oder bei der Gerinnung von Käse. Erst seit dem 19. Jahrhundert begannen Wissenschaftler, die für diese Prozesse verantwortlichen Moleküle aufzuklären. 1836 extrahierte Schwann aus dem Magensaft eine aktive Komponente, die er Pepsin nannte.<sup>1</sup> Der Begriff „Enzym“ wurde 1876 von Kühne eingeführt : „Enzym“ leitet sich aus dem griechischen Wort „zyme“ für Sauerteig ab und bedeutet ursprünglich Ferment. Nach Kristallisation der Urease 1926 durch Sumner wurde die erste Proteinstruktur eines Enzyms aufgeklärt.

Mit der Entwicklung neuer Proteinreinigungsverfahren und –strategien konnte bis heute eine Vielzahl von Enzymen aufgereinigt und isoliert werden. Es sind mehr als 3000 katalogisierte Enzyme bekannt, von denen mehrere hundert kommerziell verfügbar sind. Für die meisten Grundtypen organischer Reaktionen existiert ein Enzym-katalysiertes Pendant. Gemäß der „International Union of Biochemistry“ unterteilt man die Enzyme in sechs Hauptgruppen<sup>2</sup> :

1. Oxidoreduktasen (EC 1.X.X.X.) katalysieren Oxidations- und Reduktionsreaktionen, wobei Wasserstoff, Sauerstoff und/oder Elektronen zwischen Molekülen übertragen werden.
2. Transferasen (EC 2.X.X.X.) katalysieren die Übertragung von Atomgruppen, wie z.B. Amino-, Acyl-, Phosphoryl-, Aldehyd- oder Ketogruppen.
3. Hydrolasen (EC 3.X.X.X.) katalysieren die reversible Spaltung von Glycosiden, Peptiden, Amiden, Estern.
4. Lyasen (EC 4.X.X.X.) katalysieren Additionsreaktionen an eine Doppelbindung (z.B. C=C, C=O oder C=N) bzw. deren Rückreaktion.
5. Isomerasen (EC 5.X.X.X.) katalysieren Isomerisierungs- und Transferreaktionen innerhalb eines Moleküls.
6. Ligasen (EC 6.X.X.X.) katalysieren die kovalente Bindungsknüpfung zwischen zwei Molekülen, wobei ATP als Energielieferant dient. Diese Enzyme werden auch als Synthasen bezeichnet.



## 1.1. Enzyme als „pfiffige“ Werkzeuge für den organischen Chemiker

Es ist ausführlich dokumentiert, dass Enantiomere deutlich verschiedenartige pharmakologische Wirkungen haben können. Zunächst wurde angenommen, dass das ungewünschte Isomer (das Distomer) im Gemisch mit dem aktiven Isomer (das Eutomer) keine besondere biologische Bedeutung hat.<sup>3</sup> Es gibt aber auch biologisch aktive Distomere mit toxischer Wirkung. Auf diese Tatsache wurde man insbesondere durch die „Contergan-Affäre“ aufmerksam, als das Arzneimittel Thalomid, das als Racemat eingesetzt wurde, sich als fruchtschädigend herausstellte. Nur das (*R*)-Enantiomer wirkt dabei beruhigend auf das zentrale Nervensystem, während das (*S*)-Enantiomer jedoch eine teratogene Wirkung aufweist.

Die Nachfrage nach enantiomerenreinen Verbindungen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Dabei wird nach immer leistungsfähigeren Strategien für deren Synthese gesucht, wobei vor allem ein effizienter Chiralitätstransfer angestrebt wird, d.h. mit vorhersagbarer Richtung und mit hoher optischer Ausbeute. Reaktionen, die in lebenden Organismen durch Enzyme katalysiert werden, verlaufen mit besonders hoher Chemo- und Stereoselektivität sowie unter milden Bedingungen (Temperatur, Druck, pH-Wert). Gegenüber herkömmlichen chemischen Methoden stellt die Verwendung von Enzymen ein enormes Potential dar, wenngleich die Zahl möglicher Substrate inhärent begrenzt ist oder die Isolierung der Produkte aus der wässrigen Phase ein Problem darstellen kann. Wie die Enzym-Nomenklatur zeigt, gibt es für die meisten chemischen Reaktionstypen einen entsprechenden Biokatalysator.

Aufgrund der hohen Selektivität und der milden Reaktionsbedingungen kann auf die Verwendung von Schutzgruppen nahezu vollständig verzichtet werden. Da die meisten Enzyme bei ähnlichen (oder gleichen) Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Solvens, Temperatur, Druck) aktiv sind, ist es sogar oft möglich, mehrere Enzyme in einer Eintopf-Synthese zu nutzen. Die Nutzbarkeit von Biokatalysatoren in wässriger Lösung sowie ihre biologische Abbaubarkeit, machen enzymatische Reaktionen besonders umweltfreundlich. Die Biokatalyse spielt eine zunehmende Rolle in der asymmetrischen organischen Synthese, um neue chemische Herausforderungen zu überwinden.<sup>4-8</sup> Aus den genannten Gründen ist die Zahl der industriellen Anwendungen in den letzten Jahren stark angewachsen.<sup>9</sup>

### 1.1.1. Verfügbarkeit der Enzyme

Enzyme können für experimentelle Studien aus unterschiedlichen Organismen in ausreichender Menge isoliert werden. Für den präparativen Einsatz sind Enzyme vielfach kloniert und überexprimiert worden.<sup>10</sup>

Enzymatische Verfahren müssen mit einer Enzymproduktion und –aufarbeitung gekoppelt werden. Geeignete Enzymquellen aus der Natur produzieren meist zu geringe Mengen des gewünschten Proteins, so dass Verfahren entwickelt werden müssen, um die Enzymproduktion zu optimieren.

Enzyme werden als Katalysatoren für bestimmte Stoffumwandlungen (Biotransformationen) während des Wachstums einer Zelle benötigt. Sie spalten entweder außerhalb der Zelle Biopolymere in Monomere, die dann von den Zellen aufgenommen werden können, oder sie stellen in der Zelle bei Bedarf Stoffe bereit, die in verschiedenen Phasen des Wachstums benötigt werden. Da die Proteinbiosynthese hoch reguliert ist, muss die Repression ihrer Synthese umgangen werden, um eine hohe Ausbeute am gesuchten Protein zu gewährleisten. Dies ist durch die Entwicklung der Genetik möglich geworden. Dafür wird das Strukturgen des Enzyms isoliert und in einen geeigneten Vektor eingebaut. Solche Vektoren sind extrachromosomale lineare (Phagen, Viren) oder zirkuläre (Plasmide) DNA-Moleküle, die natürlich vorkommen. Der Vektor kann im Wirtsorganismus vermehrt und exprimiert werden. Zusätzlich tragen diese Vektoren die Information für eine Antibiotikaresistenz, so dass mit selektiven Nährmedien in Gegenwart des betreffenden Antibiotikums nur die modifizierten Bakterien wachsen. Das allgemeine Verfahren dieser Genübertragung zur Herstellung von Enzymen in anderen Organismen besteht in der Isolierung des gewünschten Gens, dessen Amplifikation durch PCR und dessen Ligation in das gewählte Plasmid. Bevorzugte Organismen zur Produktion dieser sogenannten rekombinanten Genprodukte sind *E. coli*-Bakterien.

### 1.1.2. Mechanistische Aspekte der Enzymspezifität

1894 bemerkte Fischer bei seinen Studien über Glycoside, dass die Spezifität der Enzyme gegenüber  $\alpha$ - oder  $\beta$ -konfigurierten Substraten sehr hoch sein kann. Er schlug für die Wechselwirkung zwischen Enzymen und Substraten das einfache Schlüssel-und-Schloß-Prinzip („lock and key“-Modell) vor. Es wird dabei angenommen, dass die Konformation des Enzymes starr bleibt.

Weiterhin wird die Enantioselektivität durch das von den Wechselwirkungen zwischen Therapeutika und Rezeptoren abgeleitete „three-point contact“-Modell erklärt.<sup>11</sup> Es besagt, dass mindestens drei spezifische komplementäre Wechselwirkungsstellen für die chirale Erkennung essentiell sind.

Ein weiterer Effekt bei der spezifischen Substraterkennung wird durch den „induced-fit“-Mechanismus beschrieben.<sup>7</sup> Dabei geht man davon aus, dass das native Enzym in einem nicht-aktiven Zustand existiert, in dem die zur Katalyse erforderlichen Gruppen im aktiven Zentrum noch nicht die korrekte Anordnung haben, um mit den reaktiven Stellen des Substrats in Wechselwirkung treten zu können. Erst die Bindung des korrekten Substrats im aktiven Zentrum führt zu einer konformativen Änderung des Enzyms und verschiebt die katalytischen Gruppen in die korrekte Position zu den reaktiven Substratstellen. Lipasen sind beispielsweise typische „induced-fit“-Enzyme.

Diese verschiedenen Modelle bieten eine einfache Vorstellung von den Wechselwirkungen zwischen Enzymen und Substraten, die für die Entwicklung von Inhibitoren meist oft ausreichend sind. Heutzutage können katalytische Mechanismen im Detail auch durch Röntgenstudien an Proteinen-Kristallen untersucht werden, deren Ergebnisse dazu beitragen, den Ablauf und die Enantioselektivität bestimmter enzymatischer Reaktionen vorherzusagen.

Zur Optimierung der Selektivität werden verschiedene Strategien angewendet. So kann die Selektivität durch Veränderung des Substrats oder der Reaktionsbedingungen sowie durch Modifizierung der Enzyme (Mutagenese, In-Vitro-Evolution) beeinflusst werden.

## 1.2. DHAP-abhängige Aldolasen

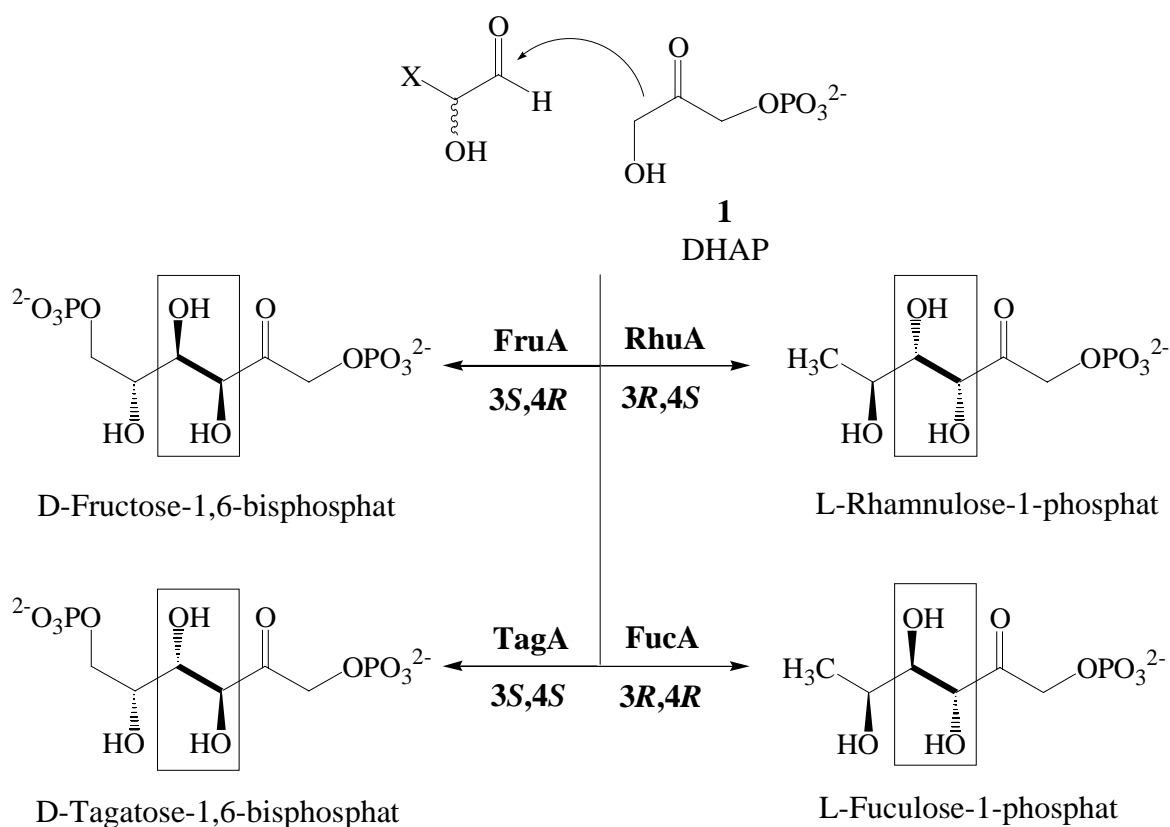
Sowohl in der Natur als auch in der Organischen Synthese ist die Aldolreaktion eine bedeutende Reaktion zur Knüpfung von C-C-Bindungen.<sup>12</sup> Für die asymmetrische Synthese wurden von Chemikern hoch effiziente Katalysatoren entwickelt. Die Natur verwendet hierzu Aldolasen, eine spezifische Gruppe von Lyasen, die typischerweise die stereoselektive Addition eines Ketondonors an einen Aldehydakzeptor katalysieren.<sup>13,14</sup> Bis heute sind über 30 Typen dieser Biokatalysatoren bekannt.

Die präparativ nützlichen Aldolasen können auf der Basis der Donorsubstrate in vier Hauptfamilien unterteilt werden:

- Dihydroxyacetonphosphat-abhängige Aldolasen (DHAP-Aldolasen), die 2-Keto-3,4-dihydroxyaddukte herstellen.
- Pyruvat- und Phosphoenolpyruvat-abhängige Aldolasen, die 3-Desoxy-2-ketosäuren herstellen.
- Acetaldehyd-abhängige Aldolasen, die 3-Hydroxyaldehyde herstellen.
- Glycin-abhängige Aldolasen, die  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -aminosäuren herstellen.

Die DHAP-abhängigen Aldolasen katalysieren die Addition von Dihydroxyacetonphosphat **1** (DHAP) an einen Aldehyd, wobei zwei neue Stereozentren gebildet werden. In der Natur sind vier stereochemisch komplementäre Aldolasen für die Retroaldol-Reaktion von diastereoisomeren Ketose-1-phosphaten zu finden:

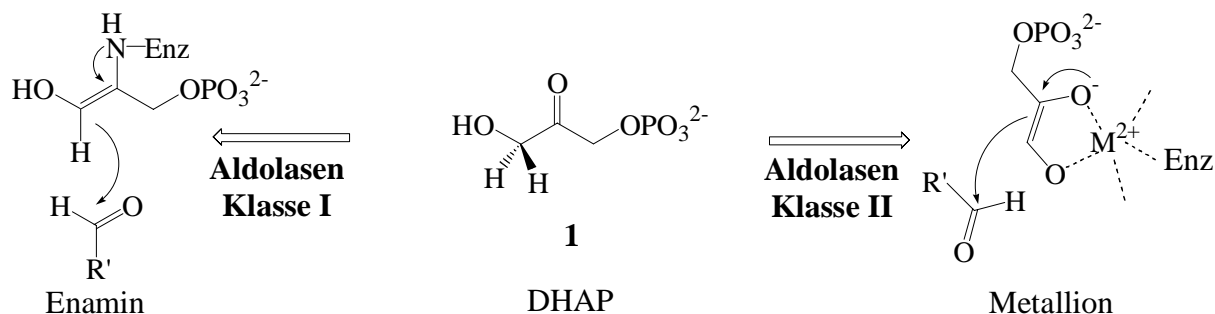
- Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (FruA)
- Rhamnulose-1-phosphat-Aldolase (RhuA)
- Tagatose-1,6-bisphosphat-Aldolase (TagA)
- Fuculose-1-phosphat-Aldolase (FucA)



**Abb. 1.1.** DHAP-abhängige Aldolasen

Auf Grund des identifizierten Katalyse-Mechanismus wird zwischen zwei Aldolase-Klassen unterschieden.<sup>15</sup> Hierbei kann die Aktivierung des Donors durch Deprotonierung auf zwei möglichen Wegen erfolgen:

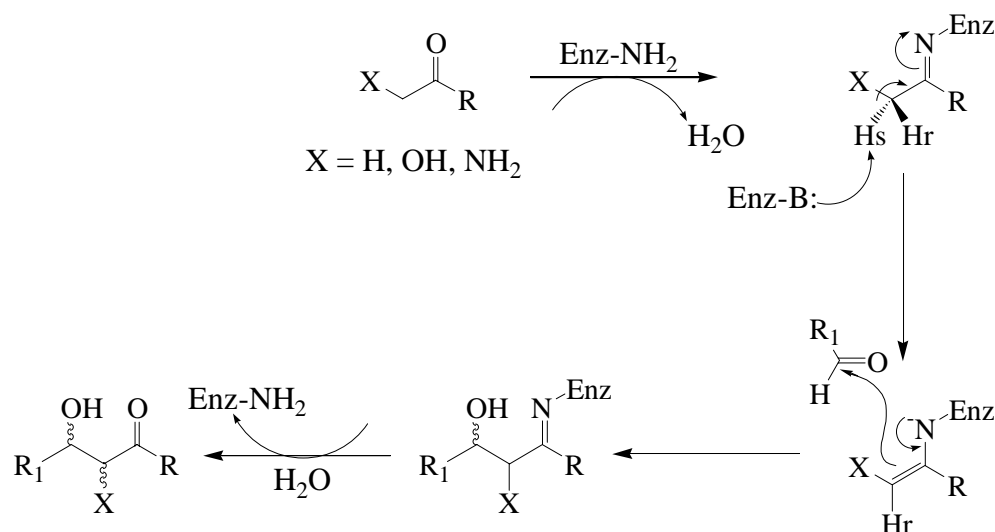
- Aldolasen der Klasse I kommen in Tieren und höheren Pflanzen vor. Die Katalyse findet mittels kovalenter Bindung an einen Lysinrest des aktiven Zentrums (Imin/Enamin-Bildung) statt.
- Aldolasen der Klasse II sind in Bakterien und Pilzen zu finden. Die Katalyse läuft durch Endiolat-Bildung unter Koordination mit einem Übergangsmetall ab, meistens  $\text{Zn}^{2+}$  (Lewis-Säure-Cofaktor).



**Abb. 1.2.** Die zwei Mechanismen der DHAP-abhängigen Aldolasen

Als Beispiele für die Klasse I- und II-Aldolase wird die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase im Detail beschrieben. Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolasen sind an zwei Hauptstoffwechselwegen beteiligt, die eine Umwandlung zwischen sechs- und dreigliedrigen Kohlenstoffeneinheiten darstellen. In der Gluconeogenese katalysieren sie die Aldoladdition einer Ketose (DHAP) und einer Aldose (Glycerinaldehyd-3-phosphat) zur Bildung der offenkettigen Form des Fructose-1,6-bisphosphates (Fru-1,6-P<sub>2</sub>). In der Glycolyse wird die umgekehrte Reaktion katalysiert.<sup>15</sup>

Klasse I-Enzyme sind Multimere von  $(\alpha/\beta)_8$ -Fass-Einheiten, die bei der Bildung der Schiff'schen Base einen aktiven Lysinrest einsetzen (Abb. 1.3). Diese Aldolasen werden hauptsächlich in höheren Organismen als Homotetramere von ungefähr 160 kDa molekularer Masse gefunden. Neuere Strukturuntersuchungen und biochemische Studien haben das Verständnis der Substraterkennung und der Katalyse verbessert.<sup>16,17</sup> Der Mechanismus wurde ausführlich untersucht, wobei die Zwischenstufen gut bekannt sind.



**Abb. 1.3.** Schematischer Mechanismus der Klasse I-Aldolasen

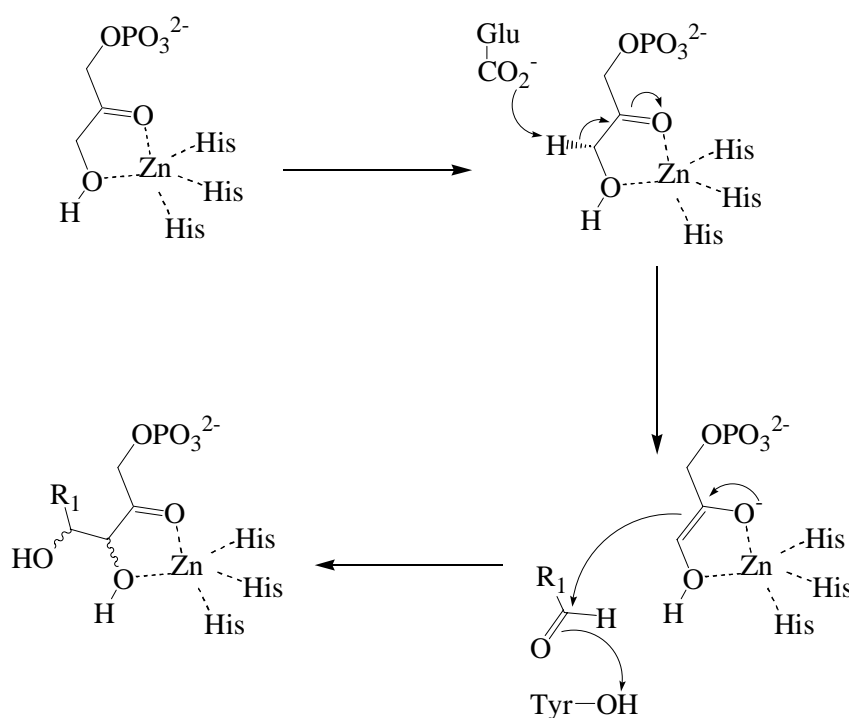
Aus kinetischen Studien wurde der Ablauf der Katalyse in 7 Stufen beschrieben. Die genauere Rolle jeder Aminosäure wurde wie im folgenden aufgeklärt.<sup>18</sup>

1. Das DHAP-Carbinolamin wird durch den nukleophilen Angriff von Lys 229 am Carbonylkohlenstoff gebildet. Lys 229 wird durch eine Wasserstoffbrücke mit Ser 300 stabilisiert, indem das Proton von Glu 187-Carboxylat abgefangen wird. Die *Re*-Seite von C-2 wird angegriffen, die *Si*-Seite von Leu270 abgeschirmt.
2. Die Schiffsche-Base von DHAP wird durch Bindung mit dem Enzym (Proton-Austausch) gebildet.
3. Die Abspaltung des Protons des 4-Hydroxyls durch Gly 187 führt zur Bildung des DHAP-Enamins.
4. Durch die Addition von G3P (Bindung C3-C4) erfolgt die Bildung der Schiff-Base von Fru-1,6-P<sub>2</sub>.
5. Das Carbinolamin wird unter Säure-Katalyse von Lys 146 durch Wasser-Addition gebildet.
6. Die Bindung zu Lys 229 wird gebrochen und es entsteht Fru-1,6-P<sub>2</sub>.
7. Beim Ablösen vom Enzym schließt sich der  $\beta$ -Furanose-Ring von Fru-1,6-P<sub>2</sub>.

Die Klasse II-Enzyme sind in Bakterien und Pilzen, nicht jedoch bei Säugetieren zu finden. Sie sind deshalb ein potentiell Ziel für die Entwicklung von antibakteriellen Wirkstoffen, da sie massiv in den Stoffwechsel von Bakterien und Pilzen eingreifen.

Bei solchen Aldolasen ist ein bivalentes Kation erforderlich, üblicherweise  $\text{Zn}^{2+}$ . Ein monovalentes Kation (z.B.  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) trägt zu der geeigneten Anordnung der Aminosäurereste des aktiven Zentrums bei. Der allgemeine Mechanismus der Klasse II-FruA verläuft entsprechend <sup>19</sup>:

- Das C1-Proton am DHAP wird abstrahiert, um das Endiolat-Ion herzustellen.
- Aus DHAP-C1 und G3P-C1 wird die C3-C4-Bindung des Fru-1,6-P<sub>2</sub> gebildet.
- Durch einen Protonentransfer wird C4=O zu C4-OH.



**Abb. 1.4.** Schematischer Mechanismus der Klasse II-Aldolasen

1999 berichteten Hunter et al. über die Röntgenstruktur des Komplexes der Klasse II-FruA aus *E. coli* mit Phosphoglucolohydroxamat (PGH).<sup>19</sup> PGH stellt ein Analogon des Endiolat-Übergangszustandes dar, wirkt als Inhibitor und wurde auch schon bei den Untersuchungen mit FucA benutzt.<sup>20,21</sup> Einzelheiten über die Struktur und den Mechanismus wurden daraus abgeleitet.

Die Struktur besteht aus zwei identischen Einheiten des verbreiteten  $(\alpha/\beta)_8$ -Faß. Das aktive Zentrum befindet sich am C-Terminus. Von den erforderlichen zwei Zn-Ionen ist ein Kation an der Oberfläche des Enzyms zu finden. Bei diesem handelt es sich um das katalytische Ion  $\text{Zn}^{2+}$ , dessen Liganden aus Lösungsmittel-Molekülen oder DHAP sowie aus drei Histidinen



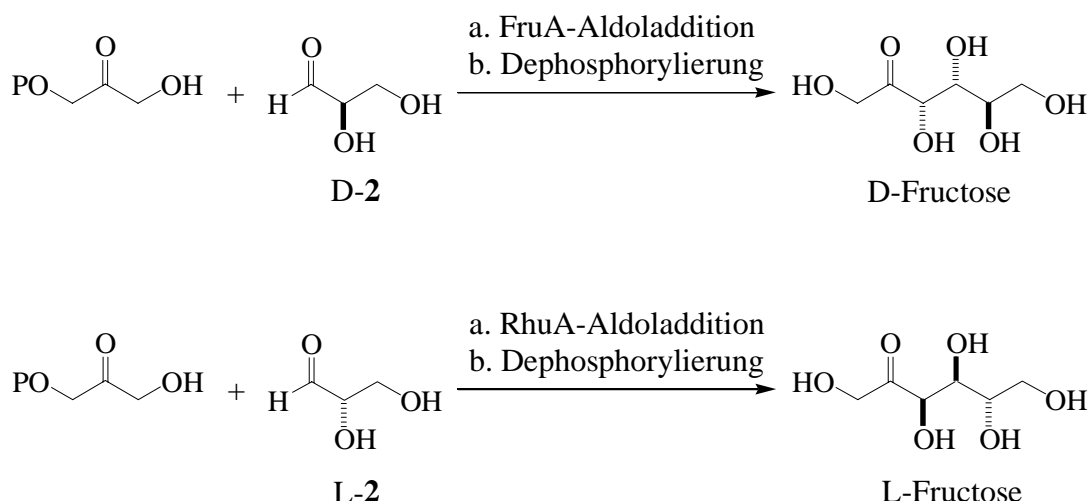
(His 110, His 226 und His 264) bestehen. Dagegen findet sich das zweite Kation im Inneren des Enzyms.

Die Klasse II-Aldolasen müssen je nach Faltung und Mechanismus weiter unterteilt werden. Ein Vergleich zwischen FruA und FucA zeigt einige Unterschiede auf.<sup>21</sup> So ist die *E. coli* FucA-Struktur ein Homotetramer von ungefähr 28 kDa-Einheiten, wobei jede Einheit aus einem  $\beta$ -Strang zwischen zwei Helices besteht und ein einziges Zn-Ion koordiniert, woraus eine andere Faltung dieser Aldolase als bei der FruA resultiert. Die unterschiedliche Umgebung des katalytischen Zn-Ions bedingt wiederum eine andere Substratbindung und durch ein anderes Zusammenwirken der verschiedenen Aminosäurereste eine unterschiedliche Stereospezifität.

### 1.3. Die enzymatische Aldolreaktion

In der Organischen Synthese ist die Suche nach Methoden, bei denen der Chiralitätstransfer effizient, vorhersagbar und unter Katalysator-Kontrolle durchgeführt wird, ein herausforderndes Ziel. Die Aldolreaktion ist eine der wichtigsten Methoden zur Knüpfung von C-C-Bindungen. Die Fähigkeit, die absolute Konfiguration eines neugebildeten Stereozentrums zu kontrollieren, ist von höchster Bedeutung in der Synthese von Naturstoffen.<sup>5,8,12</sup> Die DHAP-abhängigen Aldolasen tolerieren eine breite Palette von Akzeptorsubstraten, stellen aber strenge Anforderungen an das Donorsubstrat. Sterisch nicht gehinderte aliphatische Aldehyde,  $\alpha$ -Heteroatom-substituierte Aldehyde, Monosaccharide und deren Derivate wurden erfolgreich umgesetzt. Aromatische Aldehyde, sterisch gehinderte Aldehyde und  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehyde sind im Allgemeinen keine Substrate.

Neben den natürlichen Monosacchariden der D-Reihe können auch Zucker der L-Reihe durch Wahl geeigneter Aldolasen synthetisiert werden. So wird beispielsweise D-Fructose durch die FruA-katalysierte Reaktion von D-Glycerinaldehyd mit DHAP gebildet, während L-Fructose durch die RhuA-katalysierte Reaktion von L-Glycerinaldehyd mit DHAP hergestellt werden kann.<sup>22</sup>

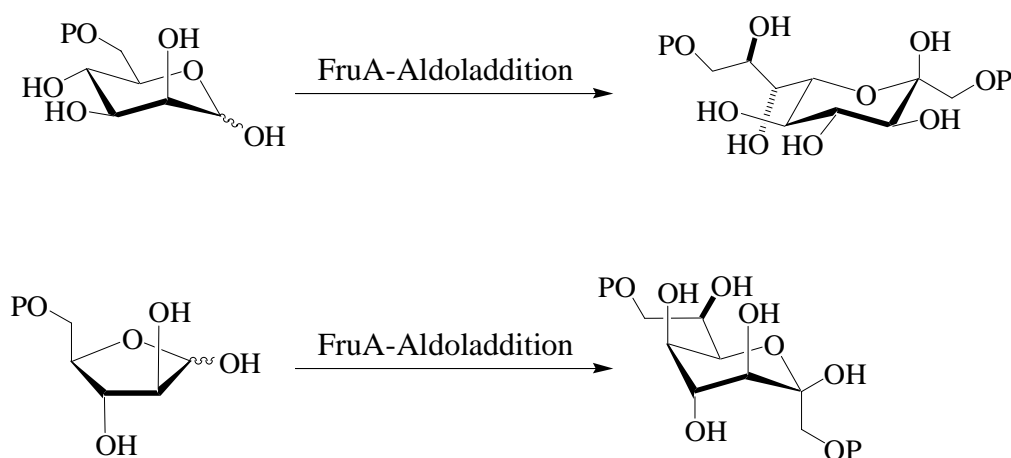


**Abb. 1.5.** Synthesen von D- bzw. L-Fructose

Die Synthese von an C-6 substituierten Glucose- oder Fructose-Derivaten gelingt durch die Verwendung eines an der 3-Position entsprechend substituierten Glycerinaldehyds.

Glycerinaldehyd **2** und dessen leicht verfügbare Derivate sind darüber hinaus vielseitige Substrate für die Synthese von enantiomerenreinen Zielverbindungen.<sup>23</sup> So dient z.B. 2,3-O-Isopropylidenglycerinaldehyd mit der freien Aldehydfunktion und dem geschützten Diol als C<sub>3</sub>-Baustein und Ausgangsverbindung zur Synthese komplexer Naturstoffe.

Die Verwendbarkeit von DHAP-abhängigen Aldolasen wurde auch bei der Synthese von <sup>13</sup>C-markierten Zuckern, Heteroatom-substituierten Zuckern, Desoxyzuckern, Fluorzuckern, höherkettigen Zuckern und Cycliten demonstriert.<sup>24</sup>



**Abb. 1.6.** Synthese von neuen höherkettigen Zuckern

Die Aldolase-katalysierte Reaktion von DHAP und Pentosen oder Hexosen bietet auch einen Zugang zu neuen höherkettigen Zuckern, die durch chemische Synthese oder aus natürlichen Quellen nur schwer zu erhalten sind. Auf diese Weise konnten Derivate von Sialinsäuren oder KDO hergestellt werden.<sup>25,26</sup>

Neben der Herstellung von neuen Zuckern stellt die Tandem-Aldoladdition eine weitere Anwendung der Aldolase vor.

### 1.3.1. Prinzip der Tandem-Aldoladdition

In der Natur erfolgen die Reaktionen bei biologischen Prozessen nacheinander ohne Isolierung von Zwischenstufen. Diese Effizienz der Biosynthesen stellt ein Vorbild für die organische Synthese dar. Im Vergleich zu klassischen linearen oder konvergenten Strategien ist die bidirektionale Synthese durch gleichzeitige zweifache Kettenverlängerung sehr effektiv und elegant. Die Anwendung von geeigneten Edukten reduziert nicht nur die notwendige Stufenzahl, sondern ermöglicht auch die Synthese von stereochemisch reinen Produkten nach einer Desymmetrisierung. Zahlreiche Beispiele von Naturstoffsynthesen basieren auf der Tandem-Reaktion, wodurch die Ansammlung von Zwischenstufen vermieden wird.<sup>27,28</sup>

Im Allgemeinen gibt es vier Möglichkeiten zur Kettenverlängerung:

- Die lineare Synthese ist eine monodirektionale Kettenverlängerung. Meistens wird sie in der Synthese von chiralen oder kurzen achiralen Ketten angewandt.
- Die konvergente Synthese bietet den Vorteil, mehrmals dieselben Zwischenstufen einzusetzen.

Unter der bidirektionalen Synthese werden noch zwei weitere Konzepte hervorgehoben:

- Die alternierende (aufeinanderfolgende) bidirektionale Synthese.
- Die simultane (gleichzeitig bidirektionale) Synthese, aus achiralen bzw. meso oder symmetrischen Bausteinen.

Die bidirektionale Synthese stellt eine leistungstarke Strategie bei der Kettenverlängerung dar, wobei ein geeignetes bifunktionalisiertes Edukt an seinen beiden Funktionen umgesetzt wird (Abb. 1.7). Je nach Art des Ausgangsprodukts läuft der Syntheseweg unter bestimmten Bedingungen ab:

— Bei den  $C_s$ -symmetrischen Molekülen ist eine Spiegelebene das einzige Symmetrieelement (die heterotopen Gruppen auf jeder Seite dieser Ebene sind enantiotop zueinander).

- ◆ Die Bildung der Stereozentren erfolgt unter Substrat-Kontrolle.
- ◆ Nur unter Reagenz-Kontrolle wird die Symmetrie aufgehoben.
- ◆ Eine Asymmetrisierung kann beide Enantiomere mit höheren *ee*-Werten liefern.

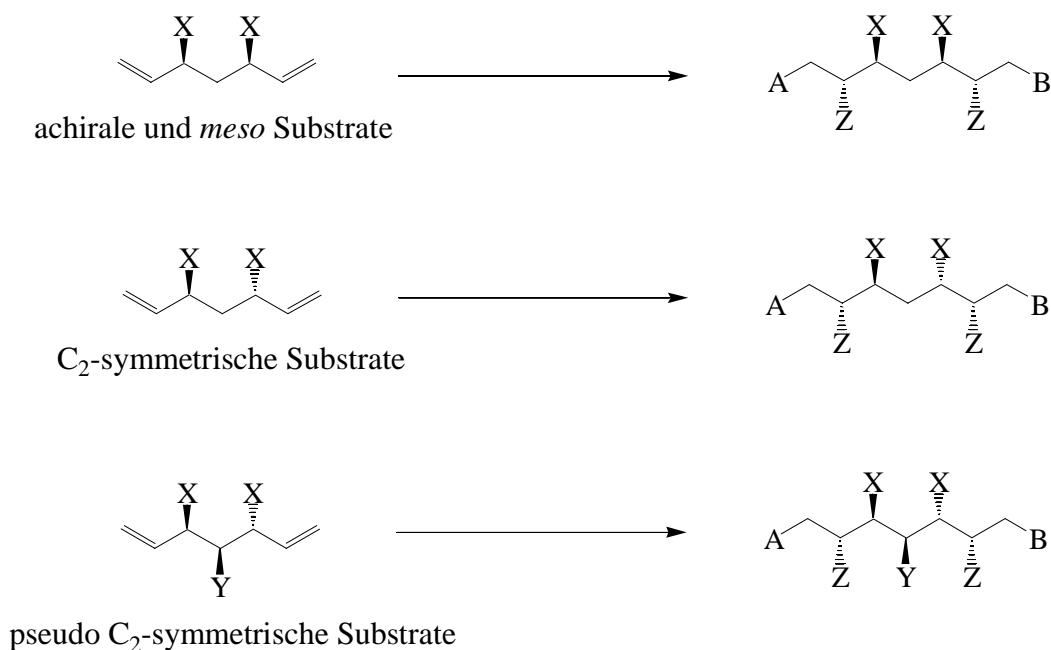
— Bei den  $C_2$ -symmetrischen Molekülen ist eine  $C_2$ -Achse das Symmetrieelement (die Gruppen sind homotop).

- ◆ Die Bildung der Stereozentren erfolgt unter Substrat-Kontrolle.
- ◆ Eine zweifache Umsetzung eines achiralen Substrats mit einem chiralen Reagenz ergibt wieder eine  $C_2$ -symmetrische Verbindung.
- ◆ Eine Asymmetrisierung ergibt sich aus einer Monofunktionalisierung.

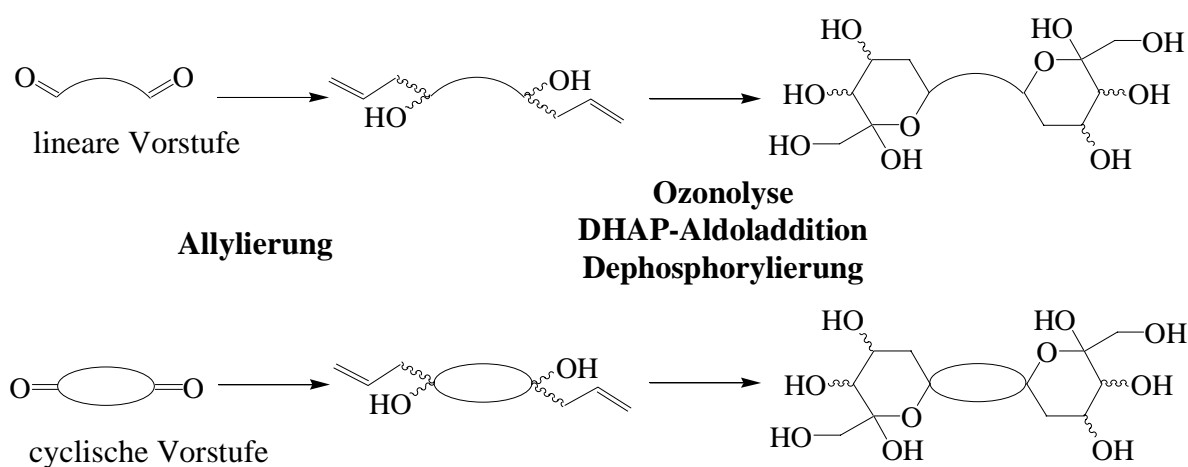
Bei einer Bifunktionalisierung können intramolekulare Funktionalisierungen vermieden und sterische Nachbareffekte ausgenutzt werden.

— Bei den pseudo- $C_2$ -symmetrischen Molekülen ist das zentrale sogenannte chirotope C-Atom das Symmetrieelement (heterotope diastereotope Gruppe).

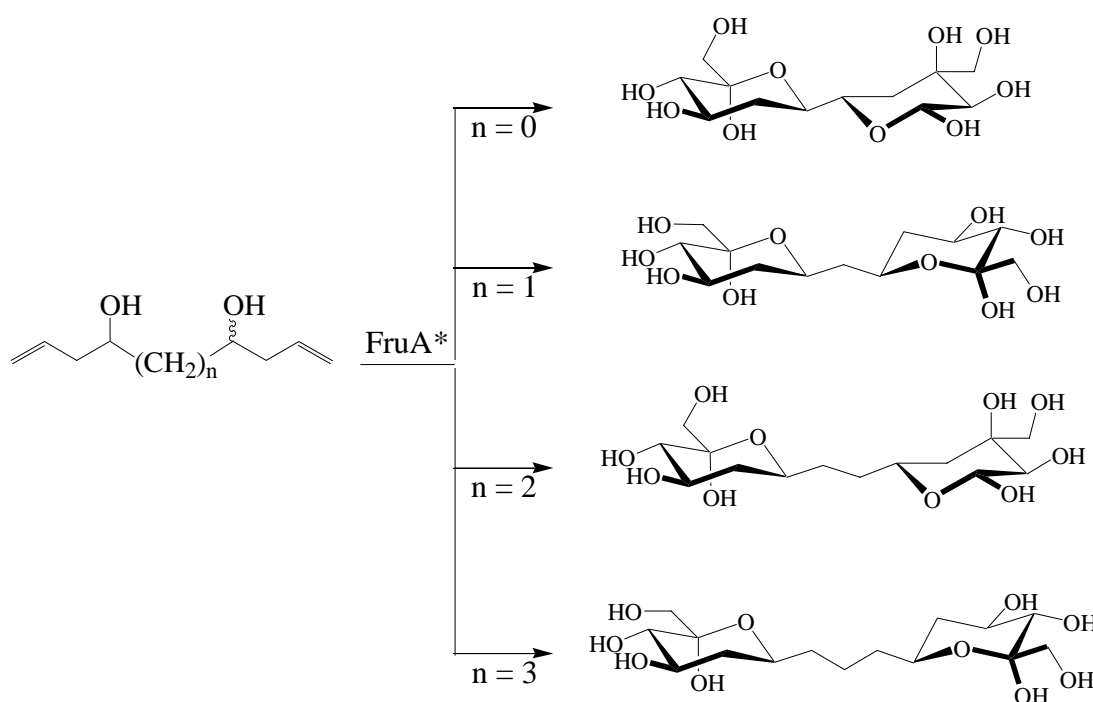
- ◆ Solchen Verbindungen werden aus einer Chiral-Pool-Synthese oder durch Umsetzung eines achiralen Substrates mit einem chiralen Reagenz hergestellt.
- ◆ eine Asymmetrisierung erfolgt durch diastereoselektive Umsetzung unter Substrat-Kontrolle: diastereotope Gruppenselektion.

**Abb. 1.7.** Bidirektionale Synthese

Dialdehyde können auch mit Aldolasen in einer bidirektionalen Reaktion eingesetzt werden, wobei zwei Äquivalente DHAP sequentiell addiert werden. Die Strategie beinhaltet zunächst eine Kettenverlängerung durch Barbier-Allylierung des symmetrischen Edukts, einer Ozonolyse und einer anschließenden enzymatischen Aldoladdition. Der Einsatz des Enzyms kann zudem die Stereoselektivität steuern lassen. Somit stellt diese Methode einen einfachen Zugang zu Kohlenhydratmimetika mit komplexen Strukturen dar.

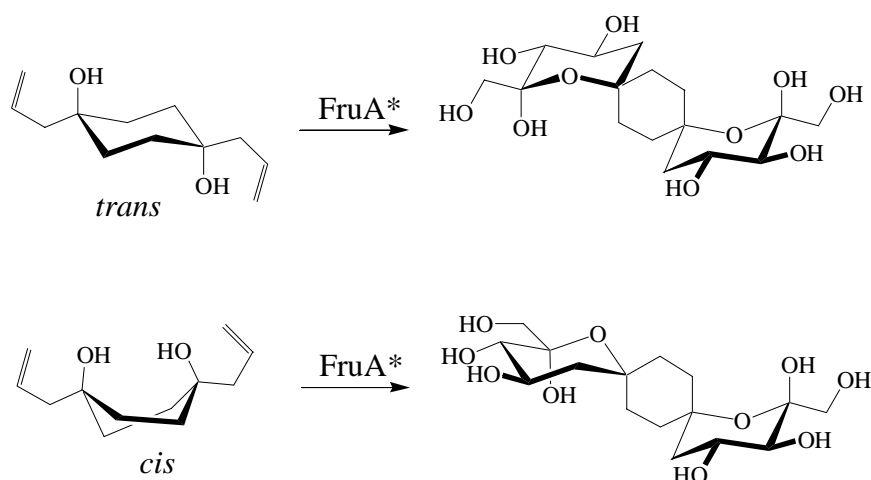
**Abb. 1.8.** Prinzip der enzymatischen Tandem-Aldoladdition

So konnte Eyrisch beispielsweise mittels Ozonolyse aus Cyclohexendiolen hydroxylierte Dialdehyde herstellen, die nach enzymatischer Aldoladdition und Dephosphorylierung zu einer neuartigen Klasse von  $C_{12}$ -Diketosen führten.<sup>29</sup> Die Untereinheiten dieser „Disaccharid-Mimetika“ sind nicht durch eine glycosidische Bindung verknüpft. Statt dessen handelt es sich um eine lange Kohlenstoffkette mit zwei reduzierenden Enden, die über passend positionierte Hydroxygruppen zu Furanosen bzw. Pyranosen cyclisieren. Weitere Beispiele mit linearen Hydroxyaldehyden wurden von Petersen und Walter realisiert.<sup>13,30,31</sup>



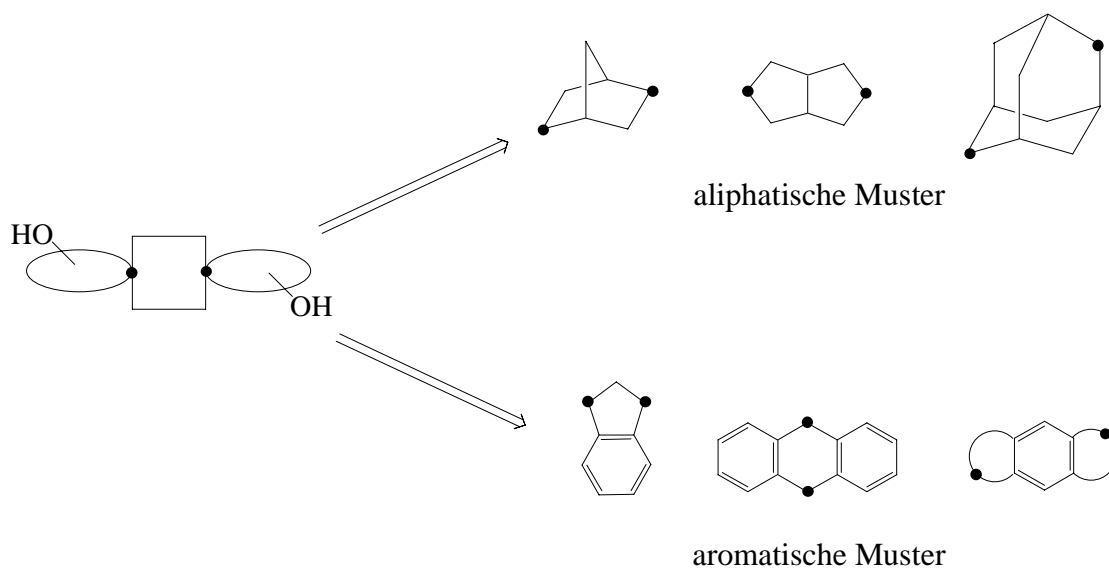
**Abb. 1.9.** Tandem-Aldoladdition aus Dihydroxy- $\alpha,\omega$ -dienen

Auch cyclische Hydroxyaldehyde wurden untersucht, wobei komplexe *spiro*-Verbindungen erhalten wurden. Das *spiro*-Muster wird durch enzymatische Aldoladdition hergestellt, wenn die Hydroxy- und Aldehyd-Gruppen sich auf einem Cyclus in einer geminalen Stellung zueinander befinden.<sup>32</sup> Die Stellung dieser beiden funktionellen Gruppen bestimmt die Bindung des Zuckers und der Pyranosering wird durch die Kettenverlängerung über eine Aldoladdition aufgebaut.



**Abb. 1.10.** Tandem-Aldoladdition aus dem Cyclohexan-Gerüst<sup>30</sup>

Andere Basisgerüste wie z.B. alicyclische Systeme oder aromatische Substrate sind ebenfalls denkbar, wobei zudem verschiedenartige Symmetrie-Muster ausgenutzt werden können.

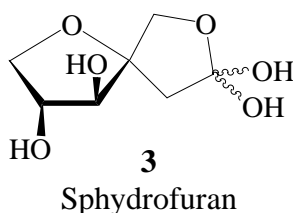


**Abb. 1.11.** Potentielle Kernstrukturen mit alternativen Symmetrie-Muster

Es könnten somit neue, komplexe Strukturen durch einen relativ einfachen Syntheseweg mit Steuerung der Stereoselektivität durch die Auswahl geeigneter Biokatalysatoren hergestellt werden.

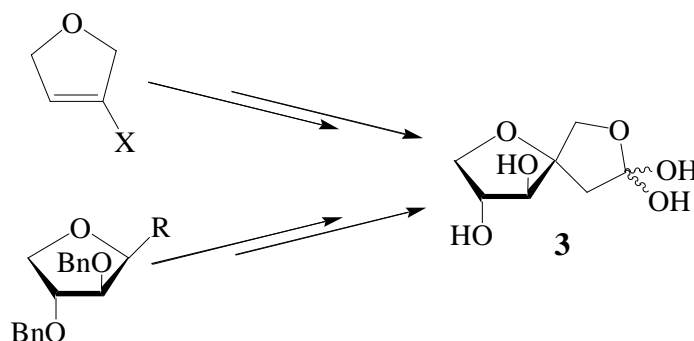
### 1.3.2. Spirozucker

Naturstoffe mit einem *spiro*-Muster stellen interessante chemische Strukturen mit potentiellen biologischen Aktivitäten dar. Die biologische Wirkung von Naturstoffen mit dem 1,7-Dioxaspiro[4.4]nonan-Gerüst wie das Sphydrofuran **3** aus *Streptomyces sp.*, einem PAF-Antagonist oder Wachstum-Promotor von Bakterien und Viren, ist hierfür beispielhaft.<sup>33</sup>



Als Saccharid-Mimetika könnten *spiro*-cyclische Zucker attraktive Eigenschaften aufweisen. Durch das rigide Gerüst befinden sich die Hydroxyl-Substituenten in einer räumlich genau definierten Position, wodurch hochspezifische Wechselwirkungen mit Rezeptorstellen möglich sind. Von großer Bedeutung in der Glycobiologie ist die Entwicklung von Mimetika der Sialyl-Lewis-X-Gruppe, einem Kohlenhydratligand für Selektine. Im Vergleich können neue Spirozucker-Mimetika fester und selektiver an Selektinrezeptoren binden.<sup>34</sup> Durch ihre strukturellen Eigenschaften wie die *spiro*-Verknüpfung, die Stereokonfiguration und die Anwesenheit von Heteroatomen stellen solche komplexen Substrate neue Herausforderungen für die Organiker dar.

Der Aufbau des *spiro*-Gerüsts von 1,7-Dioxaspiro[4.4]nonan-Derivaten konnte durch eine intramolekulare Michael-Addition aus substituierten Furanen erfolgen.<sup>33</sup>

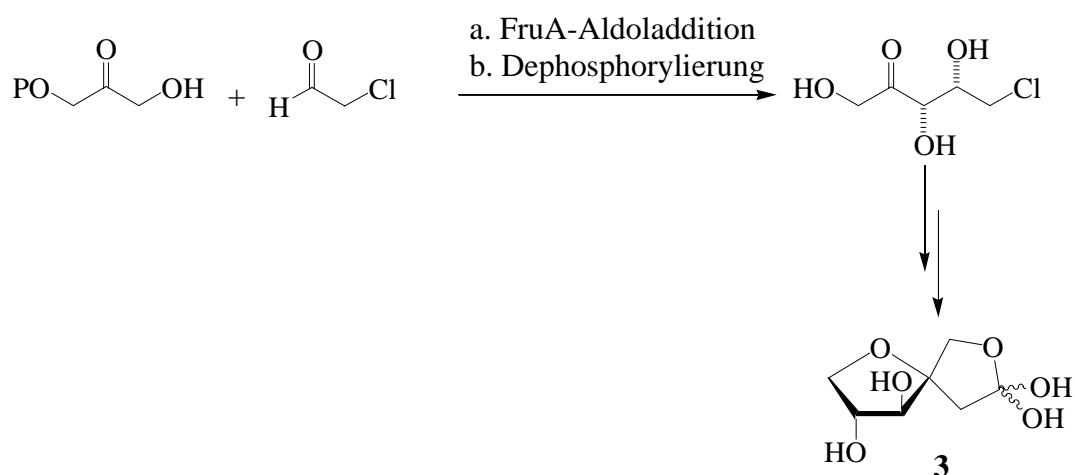


**Abb. 1.12.** Totalsynthese von Sphydrofuran **3** aus 3-tri-*n*-Butylstannylfuran und aus 2,3,5-tri-O-Benzyl- $\beta$ -D-Arabino-furanose



Ein Syntheseweg ausgehend von einer geschützten Arabinofuranose durch eine stereoselektive Ester-Enolat-Claisen-Umlagerung wurde auch beschrieben.<sup>35</sup>

Alternativ wurde **3** auch durch einen chemo-enzymatischen Weg hergestellt. Bei letzterer Synthese handelt es sich um eine FruA<sub>rab</sub>-katalysierte Aldoladdition an Chloracetaldehyd und anschließendem Aufbau der *spiro*-Verknüpfung durch eine Grignard-Allylierung und Wacker-Oxidation.<sup>36</sup>

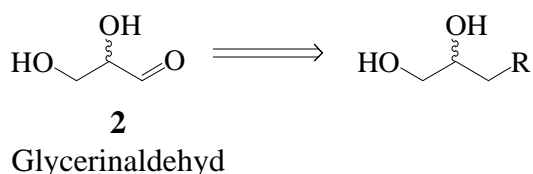


**Abb. 1.13.** Chemo-enzymatische Synthese von Sphydrofuran **3**

Die DHAP-Aldolasen stellen durch ihre relativ breite Substrattoleranz und ihre hohe Stereospezifität ein sehr interessantes Werkzeug dar, um neue komplexe Naturstoff-Analoga herzustellen.

## 2. Zielsetzung

♦ Glycerinaldehyd **2** stellt einen wertvollen chiralen Baustein für die Synthese von Kohlenhydrate (unnatürlichen Zuckern) dar. Jedes Enantiomer kann nur durch einen aufwendigen Syntheseweg aus unterschiedlichen Vorstufen erhalten werden. 1,2-Diole wie Butendiol bieten eine interessante Alternative zu enantiomerenreinem Glycerinaldehyd.

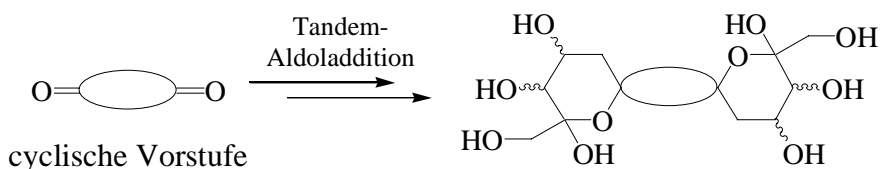


Solche enantiomerenreinen 1,2-Diole könnten durch enzymatische Racematspaltung erhalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Synthese von enantiomerenreinen Glycerinaldehydvorläufer als Substrate für die enzymatische Aldoladdition untersucht werden.

♦ Die Synthese von komplexen Oligosaccharid-Mimetika sollte am Beispiel von zwei Strategien untersucht werden, wobei die Eignung von DHAP-Aldolasen für die generelle präparative Synthese komplexer Ziele geprüft werden sollte.

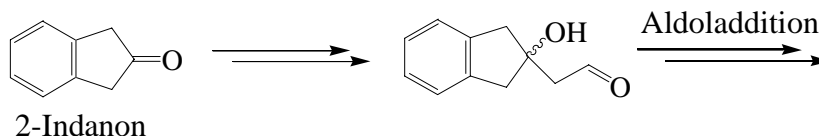
### 1. Die enzymatische Tandem-Aldoladdition

Die enzymatische Tandem-Aldoladdition sollte in einer bidirektionalen Reaktionssequenz auf bicyclische Gerüste mit unterschiedlicher Symmetrie wie dem  $C_2$ -symmetrischen Bicyclo[2.2.1]heptan oder dem  $C_{2v}$ -symmetrischen Bicyclo[3.3.0]octan erweitert werden. Der Einsatz solcher ungewöhnlicher Substratstrukturen stellt eine Möglichkeit dar, die Eigenschaften der Aldolasen generell (Substrattoleranz) sowie ihre Eignung für spezielle bidirektionale Synthesen zu testen.



Neben den Alicyclen sollten auch aromatische Systeme wie z.B. das Indan-Gerüst untersucht werden. Bei der enzymatischen Aldoladdition mit solchen Verbindungen, z.B. 1- oder 2-

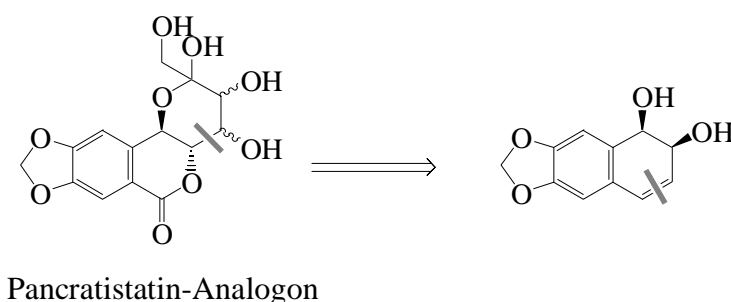
Indanon waren Probleme dadurch zu erwarten, dass die Löslichkeit der Aldehyde in Wasser durch die hydrophoben Aromaten begrenzt sein würden, außerdem war mit Eliminierung zu konjugierten Alkenen zu rechnen.



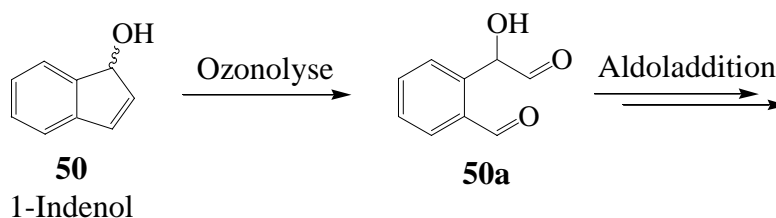
## 2. Synthese von komplexen Naturstoffanaloga am Beispiel von Pancratistatin

Strukturell modifizierte Analoga des Tumorantibiotikums Pancratistatin stellen potentielle neue Wirkstoffe dar. Die Struktur von Pancratistatin enthält einen polyhydroxylierten Cyclus, der eventuell durch einen Zuckerrest ersetzt werden kann.

Eine plausible Synthesestrategie legt nahe, dass Aldolasen für eine Kettenverlängerung auf dem Weg zum Endprodukt eingesetzt werden könnten. Dieser Hypothese sollte in Rahmen dieser Arbeit nachgegangen werden.



Das 1-Indenol **50** kann auch ein potentielles Substrat für die enzymatische Aldoladdition zu Naturstoffanaloga darstellen. Bei dem Aldehyd **50a** können das Hydroxyl und die Position der Aldehydfunktionen eine relativ gute Löslichkeit in einer wässrigen Lösung vermuten lassen.



Die Synthese von 1-Indenol wurde durch Cooxidation und durch Ringschlussmetathese (RCM) untersucht. Weitere aromatische und aliphatische Substraten wurde auch durch RCM untersucht. Die Ringschlussmetathese stellt eine attraktive Reaktion dar, um strukturell interessante cyclische Olefin herzustellen.

### 3. Glycerinaldehyd-Äquivalente durch Lipasen-katalysierte Racematspaltung

Bei der Synthese chiraler Verbindungen wird vor allem zwischen zwei Strategien, der asymmetrischen Synthese und der Racematspaltung, unterschieden. Bei der asymmetrischen Synthese wird ein achirales bzw. prochirales Edukt in ein chirales Produkt umgewandelt, wobei ein Enantiomer bevorzugt gebildet wird. Demgegenüber findet bei der Racematspaltung eine Trennung der Enantiomeren aus einem racemischen Gemisch statt.

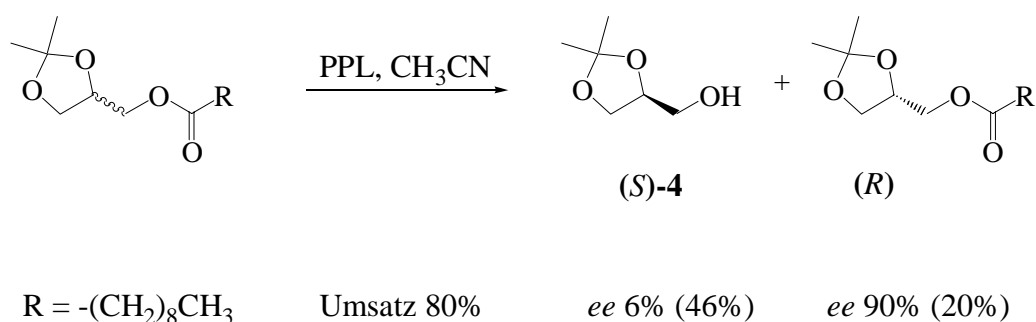
Dafür gibt es verschiedene Methoden:

- Kristallisation: Pasteur gelang 1848 die erste Racematspaltung durch manuelle Auslese der Kristalle von Tartratsalzen.
- Herstellung von Diastereoisomeren mit einem chiralen Reagenz.
- Chromatographische Trennung an einem chiralen Trägermaterial.
- Kinetische Racematspaltung, z.B. mit Enzymen.

Durch ihre Stabilität in organischen Lösungsmitteln und ihr breites Substratspektrum werden Hydrolasen, bzw. Lipasen, immer öfter für kinetische Racematspaltungen eingesetzt.

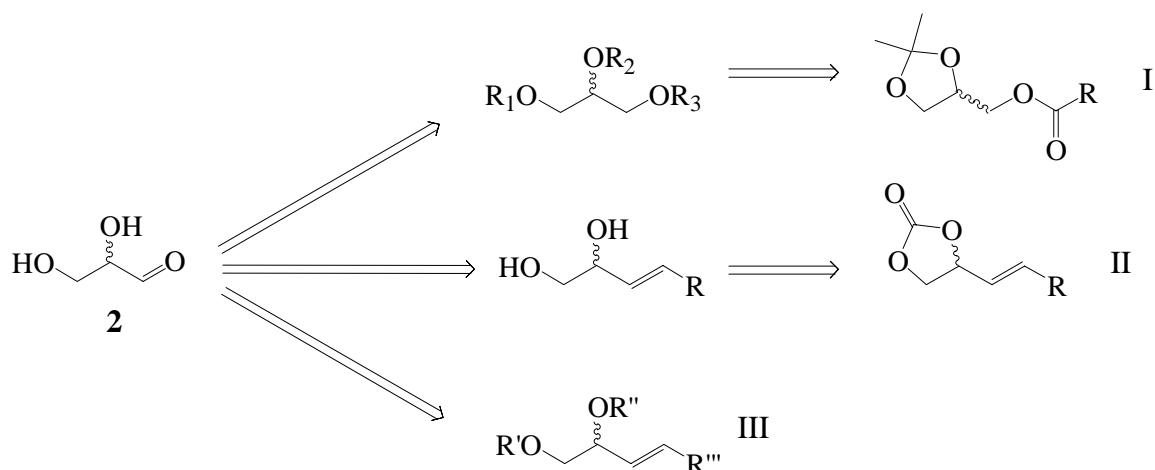
Isopropylidenglycerol **4**, auch Solketal genannt, stellt eine interessante Vorstufe für Glycerinaldehyd **2** dar. Jedes Enantiomer von **4** wurde aus mehrstufigen Synthesen ausgehend von Ascorbinsäure bzw. Mannitol erhalten.<sup>23</sup> Eine interessante Alternative zu diesen asymmetrischen Synthesen stellt die Racematspaltung zur Enantiomerentrennung dar, wobei die primäre Alkoholfunktion ausgenutzt wird.

Das als Decanoylester derivatisierte Solketal wurde dabei mit PPL hydrolysiert und der (*R*)-Ester konnte in 20% Ausbeute mit 90% *ee* erhalten werden.<sup>37</sup>



**Abb. 3.1.** Enzymatische Hydrolyse des Decanylesters

Alternativ wurden ausgehend von sowohl Carbonat-Derivaten als auch Butendiol-Derivaten weitere Strategien entwickelt, die im folgenden vorgestellt werden. Alkene aus der enzymatischen Hydrolyse von cyclischen Carbonaten II oder Butendiol-Derivaten III können chirale Diole liefern, welche als Vorstufen des Glycerinaldehyds dienen.



**Abb. 3.2.** Weitere Ausgangsprodukte zur Synthese von Glycerinaldehyd 2

### 3.1. Lipasen

Hydrolasen sind Biokatalysatoren, die reversible Spaltungsreaktionen (hydrolytischen Umsetzungen) bewirken. Sie benötigen keinen Cofaktor, zeigen ein relativ breites Substratspektrum und sind in sehr großer Zahl kommerziell verfügbar. Daher gehören Hydrolasen zu den am häufigsten von organischen Chemikern verwendeten Enzymen.

Die Enzyme aus der Familie der Hydrolasen können sehr unterschiedliche Reaktionen katalysieren:

- Hydrolyse von Amidbindungen
- Hydrolyse von Esterbindungen durch Esterasen, Lipasen und Proteasen
- Hydrolyse von Epoxiden<sup>38</sup>
- Hydrolyse von Nitrilen<sup>39</sup>

### 3.1.1. Lipasen

Triacylglycerin-Hydrolasen [EC 3.1.1.3], auch Lipasen genannt, sind weit verbreitete Enzyme, die in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren vorkommen. Lipasen haben vielfältige Funktionen im Stoffwechsel von Nahrungs- und Speicherfetten, wobei sie u.a. wasserunlösliche Triglyceride an der Grenzfläche Wasser/Öl hydrolysieren.<sup>40</sup> Ihre Gewinnung erfolgt durch Extraktion von pflanzlichem oder tierischem Gewebe (Leber, Pankreas) oder durch Kultivierung von Mikroorganismen. Durch den Einzug der Gentechnik in die Enzymproduktion werden mittlerweile auch einige rekombinante Lipasen angeboten. Ihre Anwendungsmöglichkeiten betreffen unterschiedliche Bereiche. So werden Lipasen als Substitutionspräparate bei Erkrankung der Bauchspeicheldrüse eingesetzt, als Waschmittelenzyme in der Biotechnologie verwendet oder bei der Herstellung von Käsearoma benutzt. Auch für die Organische Synthese sind Lipasen von großem Wert, da sie im Unterschied zu den meisten anderen Enzymen in organischen Lösungsmitteln erstaunlich stabil sind und zudem eine sehr breite Substratspezifität aufweisen. Sie setzen eine große Zahl aliphatischer, acyclischer und aromatischer Ester um und weisen gegenüber racemischen Estern oder Verbindungen mit mehreren Hydroxyfunktionen meist eine hohe Enantio- bzw. Regioselektivität auf.

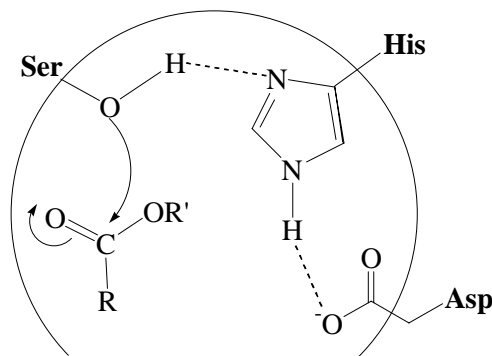
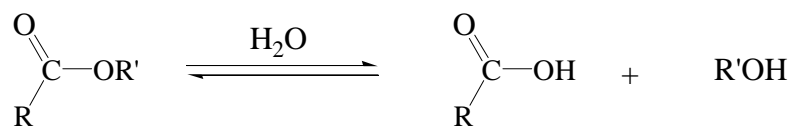
Die Verfügbarkeit der Lipasen, ihre einfache Handhabung, ihre Stabilität und Wirkungsbreite sowie die immer genaueren Kenntnisse über ihren Katalyse-Mechanismus begründen ihren Erfolg in der Synthese. Dies kommt vor allem durch die zahlreichen präparativen Anwendungen hauptsächlich bei Racematspaltungen und Desymmetrisierungen zum Ausdruck. So bieten Lipasen einen einfachen Zugang zu enantiomerenreinen Bausteinen.

### 3.1.2. Der Katalyse-Mechanismus der Lipasen

Der katalytische Mechanismus beruht auf einer von der Serin-Proteasen abgeleiteten „katalytischen Triade“, die aus Serin, Histidin und Asparagin- oder Glutaminsäure besteht (Abb. 3.3). Das nucleophile Serin wird durch ein System aus Wasserstoffbrückenbindungen der räumlich benachbarten Histidin- und Aspartat- oder Glutamat-Reste aktiviert.

Zunächst greift die Hydroxy-Gruppe des Serins nucleophil an der Carbonyl-Gruppe des Esters an, wodurch eine tetraedrische Zwischenstufe entsteht, die in einer entsprechenden Enzymtasche stabilisiert wird. Das Proton des Alkohols wird vom Imidazol übernommen (allgemeine Basenkatalyse). Der Feldeffekt des unsolvatisierten Carboxylat-Restes der Asparaginsäure hilft die entstehende positive Ladung über eine Wasserstoffbrücke am Imidazolium-Kation zu stabilisieren (elektrostatische Katalyse). Das tetraedrische Zwischenprodukt zerfällt daraufhin unter allgemeiner Säurekatalyse durch das Imidazolium-Kation. Das Proton wird wieder an den Stickstoff abgegeben und das Amin wird im Folgeschritt von Wasser verdrängt, das sich ebenfalls über eine Wasserstoffbrücke an den Imidazol-Rest anlagert.

Nun erfolgt umgekehrt der nucleophile Angriff des Wassermoleküls auf die Carbonyl-Gruppe, wobei der Imidazol-Rest wieder das Proton aufnimmt (allgemeine Basenkatalyse) und der Asparaginsäure-Rest die positive Ladung stabilisiert (elektrostatische Katalyse). Schließlich bildet sich das freie Enzym zurück und die Carbonsäure tritt aus.



**Abb. 3.3.** Die Lipase-katalysierte Hydrolyse

### 3.1.3. Lipasen in organischen Lösungsmitteln

Erst 1990 konnten die beiden ersten Lipasestrukturen durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden.<sup>41,42</sup> Sie zeigten einen einzigartigen Mechanismus: Die Grenzflächenaktivierung der Lipasen beruht auf einem amphiphilen Peptidsegment, das wie ein Deckel (lid) das aktive Zentrum des Enzyms bedeckt. Dieser Deckel verhindert in Abwesenheit einer Grenzfläche oder eines organischen Lösungsmittels den Zugang des Substrats zur katalytischen Triade im aktiven Zentrum.<sup>43,44</sup>

Die molekulare Schicht von Wasser an der Oberfläche der Lipasen reicht aus, um die katalytische Aktivität unter wasserfreien Bedingungen zu bewahren. Diese Eigenschaft ermöglicht den Einsatz der Lipasen in organischen Lösungsmitteln, was folgende Vorteile bietet<sup>45</sup>:

- Durchführung von katalytischen Reaktionen, die in Wasser zurückgedrängt werden, z.B. die Veresterung oder die Umesterung
- Einsatz von Substraten in hohen Konzentrationen, verbesserte Löslichkeit von hydrophoben Substraten
- vereinfachte Aufarbeitung des Ansatzes, z.B. bei Isolierung von hydrophoben Produkten mit Zurückgewinnung von unlöslichen Biokatalysatoren
- Erhöhung oder Änderung der Enantioselektivität.

Lipasen wirken im Allgemeinen unabhängig vom Solvens immer an demselben chiralen Zentrum, so dass es je nach Hydrolyse oder Veresterung potentielle enantiokomplementäre Synthesewege gibt.

Die Verwendung von organischen Lösungsmitteln in der Biokatalyse wird seit ungefähr fünfzehn Jahren ausführlich untersucht, vor allem bei der Verwendung von Lipasen.<sup>46-48</sup>



### 3.2. Enzymatische Racematspaltung

Enzyme können enantiotopische Gruppen unterscheiden: prochirale oder *meso*-Verbindungen und Enantiomere einer racemischen Mischung.

Prochirale oder *meso*-Verbindungen besitzen zwei chemisch identische reaktive Stellen, die enantiotop sind. Bei einer enzymatischen Umsetzung erfolgt eine chirale Diskriminierung zwischen den beiden Stellen unter Bildung eines chiralen Produktes, wobei die Symmetrieebene „zerstört“ wird. Die theoretische Ausbeute beträgt dabei 100%.

Die enzymatische Racematspaltung ist eine häufige benutzte Strategie, um enantiomerenreine Produkte zu gewinnen.<sup>1</sup> Die enzymatische Spaltung eines Racemats beruht darauf, dass ein Enantiomer schneller als das andere umgesetzt wird (kinetische Spaltung). Beide Enantiomere können in maximal 50%iger Ausbeute erhalten und häufig nach Derivatisierung chromatographisch voneinander getrennt werden. Diese Methode wird der Desymmetrisierung von prochiralen oder *meso*-Verbindungen in der Praxis meist bevorzugt, weil racemische Substrate einfacher herzustellen sind. Aus ökonomischen Gründen wurden verschiedene biokatalytische Strategien entwickelt, um aus einem racemischen Gemisch enantiomerenreine Produkte in einer theoretischen Ausbeute von 100% zu erhalten<sup>49</sup>:

- sich wiederholende Racemisierung des unerwünschten Isomers und seine erneute Racematspaltung
- dynamische Racematspaltung, wobei das Ausgangsmaterial (häufig chemisch) *in situ* racemisiert wird
- Stereoinversion des „falschen“ Isomers (chemisch oder enzymatisch *in situ*).

Die Geschwindigkeit der Umsetzung hängt von dem Verhältnis der beiden Enantiomeren ab, da dieses während der Racematspaltung nicht konstant bleibt. Die optische Reinheit sowohl des Substrats, als auch des Produkts ist daher Umsatz-korreliert.

Die Abhängigkeit der Enantiomerenüberschüsse des Substrats, des Produkts und des Umsatzes wird durch das Enantiomerenverhältnis  $E$  ausgedrückt, das ein Maß für die Selektivität der Reaktion darstellt und nur von dem System selbst bestimmt wird.<sup>50</sup>

### 3.2.1. Kinetik und Spezifität

Die Wirkung von Enzymen beruht auf der Tatsache, dass die Aktivierungsenergie des Übergangszustandes durch kovalente und nicht kovalente (elektrostatische, van-der-Waals-, H-Brücken) Wechselwirkungen des Substrats S in dem aktiven Zentrum des Enzyms E gesenkt wird. Es kommt dabei zu einem Enzym-Substrat-Komplex, dem Michaelis-Komplex ES. Um die Wirkungsweise von Enzymen zu erklären, kann man die Kinetik einer enzymatisch-katalysierten Reaktion durch ein vereinfachtes Michaelis-Menten-Schema beschreiben<sup>51</sup>:



Die Geschwindigkeitsgesetze für die verschiedenen bei der Enzym-Katalyse beteiligten Komponenten lauten:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES]$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$$

Um die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  für die Produktbildung in Abhängigkeit der Substrat- und Enzymkonzentration zu gewinnen, wird von steady-state Bedingungen für die Konzentration des Michaelis-Komplexes ES ausgegangen, d.h.  $d[ES]/dt=0$ . Damit ergibt es sich die Produkt-Bildungsgeschwindigkeit zu

$$v = k_2 \frac{[E]_0[S]}{K_M + [S]} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Dabei sind  $[E]_0$  die Anfangskonzentration an Enzym,  $k_2$  die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für die Umwandlung des Michaelis-Komplexes in die Produkte. Wird das Substrat in sehr großem Überschuss vorgelegt, erhält man die maximale Produktbildungsgeschwindigkeit:

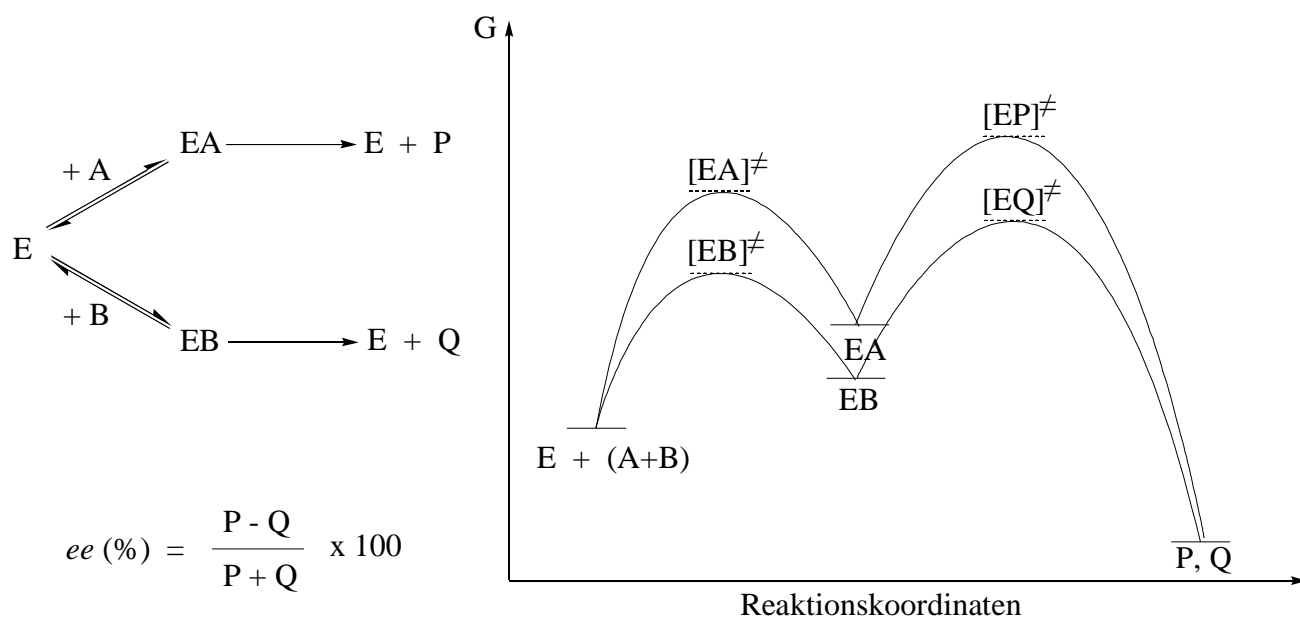
$$v_{\max} = k_2[E]_0 \quad \text{für} \quad (K_M + [S]) \sim [S]$$

Die Michaelis-Konstante  $K_M$  entspricht einer Substrat-Konzentration, für die  $v = v_{\max}/2$  ist.

$K_M$  und  $v_{\max}$  gelten als charakteristische Größen für Enzyme. Im Allgemeinen können diese kinetischen Parameter dazu beitragen, die optimalen Bedingungen für eine präparative enzymatische Synthese (Konzentration, Temperatur, pH-Wert) zu bestimmen.

Die Stereoselektivität des Enzyms findet seine Ursache in der Energiedifferenz der Michaelis-Komplexe ES. Bei einer enantioselektiven Reaktion aus einem racemischen Gemisch von A und B werden zwei diastereoisomere Enzym-Komplexe EA und EB mit zwei unterschiedlichen Energiewerten gebildet (Abb. 3.4). Ist die Freie Aktivierungsenthalpie für die Bildung von EB und die anschließende Reaktion zum Produkt P geringer als für die Konkurrenzreaktion, d.h. die Bildung von Q, dann wird B schneller als A umgesetzt.

Aus dem Produktverhältnis wird der Enantiomerenüberschuss  $ee$  (%) bestimmt.



E = Enzym,  
A, B = Substrate (Enantiomer)  
P, Q = Produkte (Enantiomer)  
 $ee$  = Enantiomerenüberschuss

**Abb. 3.4.** Energiediagramm für eine Enzym-katalysierte Reaktion

Im Fall einer irreversiblen Reaktion wird das Enantiomerenverhältnis E aus dem Umsatz c und dem Enantiomerenüberschuß wie folgt bestimmt<sup>50</sup>:

$$E = \frac{\ln [(1-c)(1-ee_S)]}{\ln [(1-c)(1+ee_S)]} = \frac{\ln [1-c(1+ee_P)]}{\ln [1-c(1-ee_P)]}$$

c = Umsatz

ee = Enantiomerenüberschuss des Substrates (S) oder des Produktes (P)

Die Enantioselektivität eines Enzyms wird allgemein durch das Enantiomerenverhältnis E bestimmt. Je größer das Enantiomerenverhältnis ist, desto größer ist auch der Enantiomerenüberschuß des Produktes und des verbliebenen Substrates (E stellt das Verhältnis der Reaktivität zwischen dem schnell umgesetzten Enantiomer und dem langsamen dar.). Niedrige E-Werte können durch eine zunehmende Geschwindigkeit des „langsameren“ Enantiomers oder durch eine abnehmende Geschwindigkeit des „schnelleren“ Enantiomers verursacht werden.<sup>52</sup>

### 3.2.2. Enantioselektivitätsprognosen

Bei der Reduktion von Ketonen durch Hefe aus *Culvaria lanata* postuliert die Prelog-Regel, dass der Wasserstoff von der Seite des voluminöseren Substituenten (G) aus addiert wird (Abb. 3.5).<sup>53</sup> Mit drei Enzymen, nämlich der Cholesterol Esterase, der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* und der Lipase aus *Candida rugosa*, wurde von Kazlauskas et al. eine Studie durchgeführt, um die Enantioselektivität voraussagen zu können.<sup>54</sup> Durch die Erweiterung der Prelog-Regel auf Hydrolasen wird für Ester von sekundären Alkoholen vorausgesagt, dass das Enantiomer A (R-Konfiguration) schneller umgesetzt wird. Die Regel kann auch auf primäre Alkohole (B) angewandt werden.<sup>55</sup>



**Abb. 3.5.** Enantiopräferenz bei sekundären und primären Alkoholen

Diese Erkenntnis führte zu einem erheblich verbesserten Verständnis der enzymatischen Substratspezifität, so dass auf den Größenunterschied der Substituenten basierende rationale Strategien entwickelt wurden.

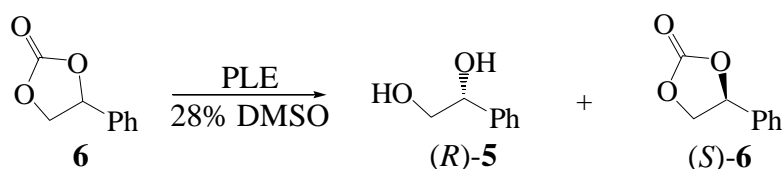
### 3.3. 1,2-Diole durch enantioselektive Hydrolyse cyclischer Carbonate

Enantiomerenreine C<sub>3</sub>-Bausteine stellen wertvolle Ausgangsstoffe für die Arzneimittelforschung dar. So dienen beispielsweise 1,2-Propandiole als Ausgangsverbindungen für antivirale und kardiovaskuläre Wirkstoffe.<sup>56,57</sup>

Als ein nützliches Verfahren zur Synthese solcher optisch aktiver Diole hat sich die enzymatische, enantioselektive Hydrolyse von cyclischen Carbonaten bewährt. Diese können sowohl fünf- als auch sechsgliedrig sein.

#### 3.3.1. Anwendungen

Page et al. haben die Racematspaltung von racemischen 1,2-Diolen aus den entsprechenden Carbonaten untersucht. Das (*R*)-1-Phenyl-1,2-ethandiol **5** wurde durch die PLE-katalysierte Hydrolyse des racemischen cyclischen Carbonats **6** hergestellt.<sup>58</sup>

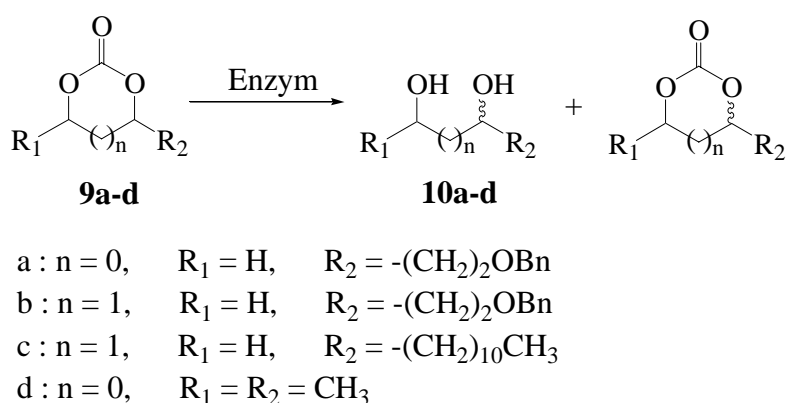


**Abb. 3.6.** Enzymatische Hydrolyse von **6**

Die Hydrolyse erfolgte in einem Phosphatpuffer mit 28% DMSO. Die Reaktion war bei 50% Umsatz beendet, wobei dies ein Beweis dafür sein kann, dass nur ein Enantiomer hydrolysiert wurde. (*R*)-**5** wurde mit 97% *ee* und 85% Ausbeute erhalten, (*S*)-**6** mit 78% *ee* und 80% Ausbeute.

Matsumoto et al. haben ausführliche Studien über die enzymatische Hydrolyse von cyclischen Carbonaten vorgestellt (Abb. 3.7). Dabei wurde erstmals die Racematspaltung mit PPL an 4-(2-Benzyloxy)ethyl-1,3-dioxolan-2-one **9a** untersucht.<sup>59</sup> Die optimierten Bedingungen für die

enzymatische Reaktion bestanden in der Verwendung von wasserunlöslichem Isopropylether (10% als Cosolvens) bei niedriger Temperatur (10°C) und in einer Reaktionszeit von 12 h. Mit wasserlöslichen Lösungsmitteln als Cosolvens (*tert*-Butanol, DMSO, Aceton) konnte keine Verbesserung der Reaktivität festgestellt werden. Bei Verwendung von unpolaren Solventien wie Toluol nahm die Reaktivität sogar ab. Weiterhin beeinflusste die Struktur der Substituenten des Carbonats die Enantioselektivität. So wurden Substituenten mit längeren Ketten besser differenziert (höhere E-Werte).<sup>60</sup>



**Abb. 3.7.**        Enzymatische Hydrolyse von Carbonaten

Diese Strategie konnte auch erfolgreich für die enantioselektive Hydrolyse mit PPL von sechsgliedrigen Carbonaten zu den entsprechenden 1-substituierten 1,3-Diolen angewandt werden.<sup>61</sup>

- 4-(2-Benzyloxy)ethyl-1,3-dioxan-2-on **9b**: Die Hydrolyse erfolgte mit 30% Isopropylether in einem Phosphatpuffer (pH 6.5) bei 10°C und einer Reaktionszeit von 12 h. Das (*S*)-Diol wurde bei 78% Umsatz in 65% Ausbeute mit 28% *ee* erhalten und das (*S*)-Carbonat ((*R*)-Diol nach Hydrolyse des Carbonates) in 24% Ausbeute mit *ee* > 99%, woraus ein Enantiomerenverhältnis von 8 resultierte.
- 4-Undecyl-1,3-dioxan-2-on **9c**: Die Racematspaltung dieses langkettigen und wasserunlöslichen Substrats benötigte 50% Cosolvens. Das (*R*)-Diol wurde bei 81% Umsatz in 55% Ausbeute mit 23% *ee* (Reaktionszeit von 24 h) erhalten, das (*S*)-Carbonat in 27% Ausbeute mit 98% *ee*, was einem Enantiomerenverhältnis von 6 entspricht.

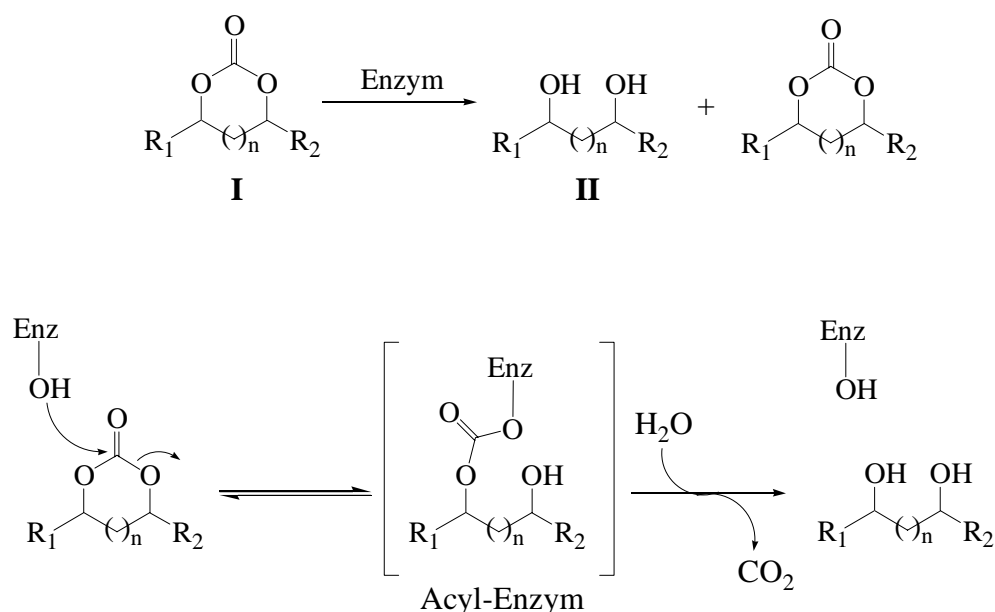
In neueren Untersuchungen haben Matsumoto et al. über die enantioselektive mikrobielle Hydrolyse von substituierten Carbonaten berichtet.<sup>62</sup> Solche Verbindungen stellen attraktive C<sub>2</sub>-symmetrische Dirole dar. Nach einem Screening von Mikroorganismen zeigten die

Bakterien *Pseudomonas diminuta* mit 4,6-Dimethyl-1,3-dioxolan-2-on **9d** vielversprechende Ergebnisse. Konkurrierende Oxidations/Reduktions-Prozesse mussten durch Zugabe von geeigneten organischen Lösungsmitteln abgeschaltet werden. Die Oxidoreduktase wurde am einfachsten durch ein wasserlösliches Cosolvens (8% THF) inhibiert. Weitere fünfgliedrige cyclische Carbonate mit unterschiedlichen Substituenten waren schlechtere Substrate bei höherer Spezifität des Mikroorganismus. Die enzymatische Hydrolyse von sechsgliedrigen cyclischen Carbonaten wie dem *dl*-**9d** erfolgte enantioselektiv ( $E = 75$ ) und mit einem Umsatz von 51%. In diesem Fall war keine Zugabe von THF notwendig, da die Oxidation des Diols als Produkt der Hydrolyse nicht festgestellt wurde. Die enzymatische Hydrolyse mit *Pseudomonas diminuta* lieferte beidesmal das (*R,R*)-Diol. Das (*S,S*)-Carbonat dagegen wird langsamer umgesetzt.

### 3.3.2. Mechanismus der enzymatischen Hydrolyse von cyclischen Carbonaten

Das Enzym dockt zuerst an der Carbonylgruppe des Substrates an, gefolgt von der Hydrolyse des gebildeten Acyl-Enzym-Übergangszustands (Abb. 3.8). Die erste Stufe ist reversibel, die zweite allerdings irreversibel, da die Acylgruppe des Substrates als Kohlendioxid aus dem Reaktionssystem entfernt wird. Der Umsatz ist häufig auf 50% begrenzt, wobei eine gute Enantioselektivität gewährleistet wird. Nach der enzymatischen Hydrolyse werden das nicht umgesetzte cyclische Carbonat und das entstandene Diol als optisch aktive Produkte (*ee* von 90 bis 99%) erhalten. In den meisten Fällen ist das Carbonat (*R*)- und das Diol (*S*)-konfiguriert. Auf Grund ihrer unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften (Siedepunkt, Polarität) können diese Verbindungen einfach getrennt werden.

Mit steigender Kohlenstoffzahl der Substituenten nimmt die Enantioselektivität bemerkenswert zu. Im Einklang mit der „Kaslauskas“-Regel liegt dies vermutlich im Größenunterschied der Substituenten am Stereozentrum begründet.



**Abb. 3.8.** Enzymatische Hydrolyse von cyclischen Carbonaten

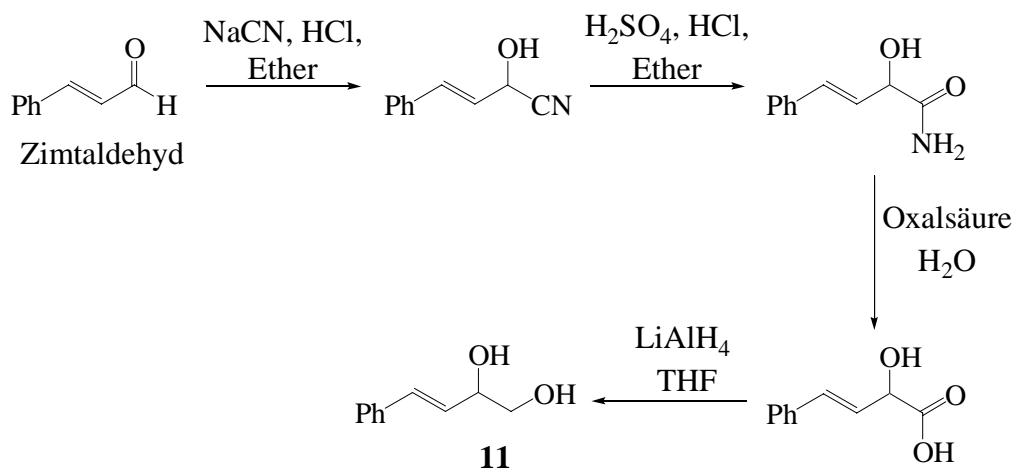
### 3.3.3. Enzymatische Racematspaltung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol

Die von Page et al. beschriebenen Ergebnisse sollten nun unter analogen Reaktionsbedingungen reproduziert werden. Dazu wurden 41 mg (0.25 mmol) Carbonat **6** in 29.5 mL Natriumphosphatpuffer (0.1 M, pH = 7.4) und 11.5 mL DMSO (28%) gelöst und mit 22.5 µL einer Emulsion von PLE (0.04 mg Protein/µL) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 7 Tagen wurde ein Umsatz von 55% erreicht. Das Carbonat und das Diol wurden quantitativ nach Extraktion zurückgewonnen. Der Enantiomerenüberschuss wurde durch chirale Gaschromatographieanalyse bestimmt: 46% *ee* für das Diol (*R*)-**5** und 24% *ee* für das Carbonat (*S*)-**6**. Sowohl die Ausbeuten als auch die Enantiomerenüberschüsse lagen jedoch erheblich unter den Literaturwerten. Vermutlich war die Qualität der PLE-Lösung nicht mehr ausreichend. Daneben kann die enzymatische Lösung auch noch Isoenzyme mit anderen Spezifitäten enthalten.

### 3.3.4. Enzymatische Racematspaltung von 4-Phenyl-3-buten-1,2-diol

Die Racematspaltung von 4-Phenyl-3-buten-1,2-diol **11** wurde durch enzymatische Hydrolyse des entsprechenden cyclischen Carbonats **12** untersucht.

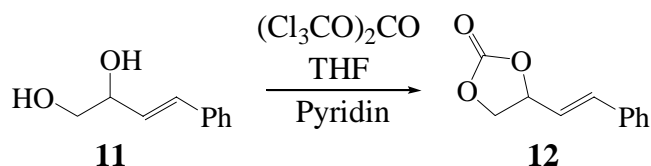




**Abb. 3.9.**      Synthese von 4-Phenyl-3-buten-1,2-diol **11**

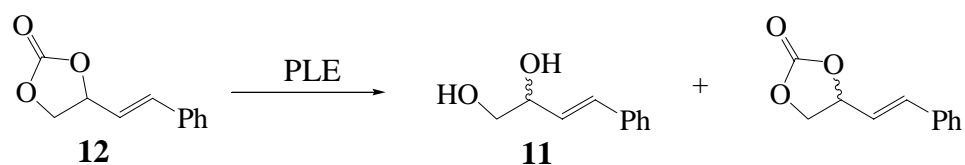
Die Synthese des racemischen Diols **11** ging aus von Zimtaldehyd. Dabei wurde der Aldehyd zunächst zum Cyanhydrin umgesetzt und anschließend über das Hydroxyamid zur α-Hydroxycarbonsäure hydrolysiert. Nach Reduktion mit LiAlH<sub>4</sub> konnte das Diol in 76% Gesamtausbeute erhalten werden.<sup>30,63</sup>

Das cyclische Carbonat 4-Styryl-1,3-dioxolan-2-on **12** wurde durch Behandlung des Diols **11** mit Pyridin und Bis(trichlormethyl)carbonat (Trisphosgen) in 45% Ausbeute hergestellt.



**Abb. 3.10.**      Synthese von **12**

Für die Racematspaltung wurden diverse Enzyme (PLE, PPL, Lipase PS, L-1, L-2, L-3, L-4, L-5, L-6, L-7, L-8, E-1), Cosolventien (1%; DMSO, *tert*-Butanol, Isopropanol, Anisol, Chloroform) und unterschiedliche Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur, 40°C) untersucht. **12** ist nicht wasserlöslich und geht selbst mit Cosolventien schwer in Lösung, so dass praktisch kein Umsatz beobachtet werden konnte. Vermutlich besitzt die ungesättigte Kette mit dem Phenylrest im Vergleich zu einem aliphatischen Substituenten eine zu rigide Konformation.<sup>60</sup> Das Substrat wird daher sehr schlecht oder gar nicht von dem Enzym erkannt.



**Abb. 3.11.** PLE-katalysierte Hydrolyse von **12**

Enzym	Umsatz / %	Diol <b>11</b> <i>ee</i> / %	Carbonat <b>12</b> <i>ee</i> / %
PLE (RT)	37	3	9
PLE (40°C)	81	2	3
PPL	0		

Diese im Vergleich zu der Literatur niedrigen *ee*-Werte und Umsätze weisen auf die schwierige Handhabung der enzymatischen Hydrolyse des Carbonates hin. Für weitere Versuche muss die Löslichkeit des Substrates verbessert werden (Lösungsmittel, Gemisch von Lösungsmitteln, konzentrierte Lösung an Substrat). Außerdem sollte die Qualität der Enzyme nochmals geprüft werden.

### 3.4. Enzymatische Diskriminierung von 3-Buten-1,2-diolen

#### 3.4.1. Racematspaltung durch Umesterung

Der Einsatz von Biokatalysatoren in organischen Lösungsmitteln ermöglicht es, effiziente und selektive Um- oder Veresterung ohne Wasserbildung durchzuführen. Wird bei einer Umesterung (Acylaustausch) kein Wassermolekül abgespalten, bewirkt dies einen konstanten Wassergehalt in der Reaktionslösung. Die Wassermoleküle sind fest an der Oberfläche des Enzyms gebunden (durch die Wasseraktivität  $a_w$  messbar) und nicht chemisch verfügbar, so dass die enzymatische Aktivität erhalten bleibt. Jegliche Spuren von chemisch verfügbarem Wasser werden anstatt des Acyldonors schnell verbraucht.

Im Gegensatz zur Hydrolyse, bei der das Nucleophil (Wasser) immer im Überschuß vorhanden ist, bleibt die Konzentration des Acyllieferanten bei der Acyl-Transfer-Reaktion

begrenzt. Umesterungen mit „normalen“ Estern laufen im Allgemeinen reversibel ab; d.h. mit langsamerer Geschwindigkeit bei schlechterer Selektivität.<sup>64</sup>

Es ergeben sich zwei Möglichkeiten, um die Acyl-Transfer-Reaktion irreversibel verlaufen zu lassen:

- Überschuß an Acyldonor, wobei die enzymatische Aktivität beeinträchtigt werden kann
- Einsatz eines „geeigneten“ Acyldonors, aktivierte Ester, wie 2-Haloethyl, Cyanomethyl- und Oximestern, wobei der Ablauf „quasi-irreversibel“ ist. Das Gleichgewicht der Reaktion wird zum Produkt verschoben, wenn die Nucleophilie des abgespaltenen Restes schwächer als der des Acyldonors ist. 2-Haloethylester werden öfter angewandt, z.B. Trifluoroethylester, da das Trifluoroethanol bei der Aufarbeitung leicht flüchtig ist. Cyanomethylester werden wegen der Toxizität der Cyanderivate selten benutzt.<sup>65,66</sup> Mit Oximestern wird bei der Acylierung ein schwach nucleophiles Oxim erzeugt, das als Nebenprodukt schwierig zu entfernen sein kann. Anhydride als Acyldonoren wurden auch bereits untersucht.<sup>67,68</sup>

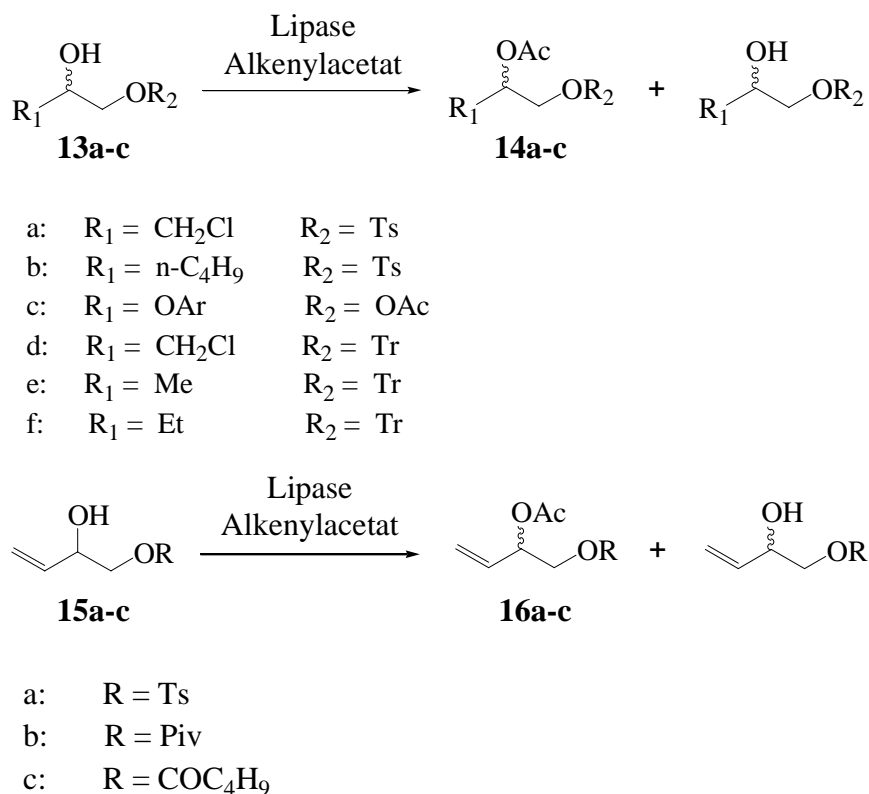
Diese verschiedene aktivierten Acyldonor sind im Allgemeinen nicht reaktiv genug. Dazu können weitere Problemstellungen bei ihrem Einsatz auftauchen, wie z.B. schwierige Aufarbeitung wegen der erzeugten toxischen Nebenprodukte und daraus bedingte Enzyminhibierung. Eine sehr effiziente Methode für die Umesterung stellt die Verwendung von Enolestern dar.<sup>69</sup> Aus Enolestern (Vinyl- und Isopropenylester) werden instabile Enole als Coprodukte erzeugt, die sich in flüchtige Aldehyde oder Ketone (Acetaldehyd, Aceton) umwandeln, wobei die Umsetzung schneller und praktisch irreversibel abläuft. Aus sterischen Gründen sind Vinylester bessere und deutlich reaktivere Acyldonoren als die entsprechenden Isopropenylester. Der entstehende Acetaldehyd kann aber als Elektrophil das Enzym inhibieren. Doch bieten die Immobilisierung oder Adsorption des Biokatalysators auf Kieselgur oder die Zugabe von Molekularsieb annehmbare Lösungen.

Neuerdings haben sich Ethoxyvinylester als leistungsstarke Acyldonoren erwiesen.<sup>70,71</sup> Zum Beispiel stellt Ethoxyvinylacetat ein „irreversibles“ Reagenz dar, das keine inhibierenden Nebenprodukte (Ethylacetat) erzeugt.

### 3.4.2. Anwendungen

Zur Auswahl der möglichen Ausgangsprodukte kann die „Kazlauskas-Regel“ herangezogen werden. Der große Substituent soll bei der enzymatischen Umsetzung als sterisches Auxiliar stabil, danach aber einfach abspaltbar sein. Als sterisch anspruchsvolle Substituenten werden

verschiedene Reste bei der Racematspaltung von 1,2- oder 1,3-Diolen verwendet. Häufig verwendet wird die Alkoxymethyl-Gruppierung wie Phenyl, Tosyl, Trityl und *tert*-Butyl. Solche Etherfunktionalitäten lassen sich unter sauren Bedingungen leicht entfernen.



**Abb. 3.12.** Veresterung von substituierten  $\beta$ -Hydroxyestern

Chen et al. haben die enzymatische Veresterung von substituierten  $\beta$ -Hydroxytosylaten **13a-b** mit Isopropenylacetat in Hexan untersucht.<sup>72</sup> Die besten Ergebnisse erzielte die Arbeitsgruppe mit der Lipase aus *Pseudomonas fluorescens*:

- aus dem Chlormethyl-substituierten Derivat **13a** wurde das Acetat (*S*)-**14a** mit 83% *ee* hergestellt (Reaktionszeit von 68 h, Umsatz von 47%, *E* = 24) und
- aus dem 1-Butyl-substituierten Derivat **13b** das Acetat (*R*)-**14b** mit 86% *ee* (Reaktionszeit von 92 h, Umsatz von 43%, *E* = 26).

Bei der enzymatischen Veresterung von 1-*O*-Tosyl-Derivaten in organischen Solventien wurde unter Standardbedingungen der gewünschte 50%ige Umsatz erst bei sehr langen Reaktionszeiten erreicht, weil das Enzym durch die entstehende *p*-Toluolsulfonsäure deaktiviert wurde. Die Zugabe eines Amins stellte einen Lösungsansatz dar, wobei man sogar schneller 50% Umsatz erreichte und eine verbesserte Enantioselektivität erhielt.<sup>73</sup> Aus der

Acetylierungsreaktion mit der Lipase PS-30 und Vinylacetat wurden aus dem 1-Tosyloxy-3-buten-2-ol **15a** mit Zugabe von Triethylamin der Alkohol (*S*)-**15a** mit 98% *ee* und das Acetat (*R*)-**16a** mit 96% *ee* (Reaktionszeit von 24 h,  $E > 200$ ) erhalten.

Vergleichbare Studien mit den Pivaloylderivaten **15b** hatte Walter beschrieben.<sup>13</sup> Bei der Lipase PS katalysierte Veresterungen mit Isopropenylacetat in MTBE mit Toluol als Cosolvens wurde das Acetat (*S*)-**16b** in 55% Ausbeute mit 95% *ee* gebildet. Die gleiche Reaktion sollte mit Vinylacetat auf Grund seiner höheren Reaktivität schneller als mit Isopropenylacetat verlaufen.

1999 hatten Secundo et al. die Ergebnisse der Racematspaltung von 2-Hydroxy-3-butenylbutanoat **15c** durch Veresterung mit Vinylacetat in Petrolether bei 15°C veröffentlicht, wobei die (*R*)- und (*S*)-Enantiomere mit 99% *ee* erhalten wurden.<sup>74</sup>

Weitere Schutzgruppen wie Trialkylsilylether (*tert*-Butyldimethylsilyl oder 1-Thexyldimethylsilyl) stellen durch ihre Stabilität gegenüber Hydrolyse auch während chromatographischen Trennungen attraktive Schutzgruppen dar.<sup>75</sup> Das 1-Thexyldimethylsilyloxy-Derivat hat sehr gute Ergebnisse geliefert.<sup>76</sup> Die Racematspaltung durch Verseifung von 2-Chloracetoxy-1-thexyldimethylsiloxy-3-buten mit der Lipase aus *Pseudomonas* verlief hoch selektiv zu dem sekundären geschützten (*R*)-Alkohol (97% *ee*). Der gebildete (*S*)-Ester (99% *ee*) wurde mit der Lipase aus *Candida cylindracea* unspezifisch in 85% verseift.

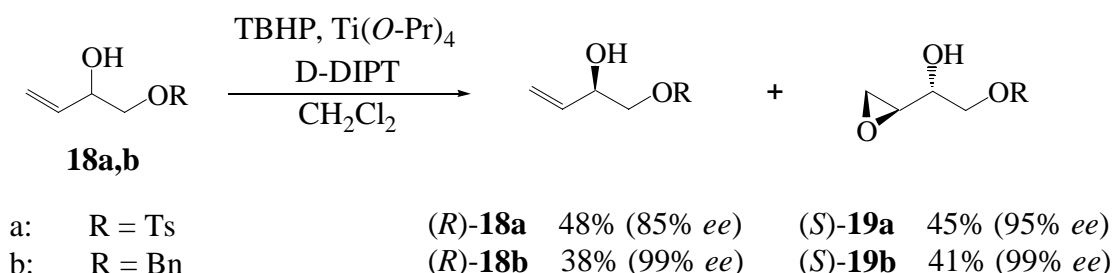
Die korrespondierenden 1-*O*-Acyl-geschützten Derivate (Benzoyl-, Methylbenzoylester) wurden ohne Diskriminierung umgesetzt. Die Hydrolyse von 2-Acetoxy-1-tosyl-3-buten **16a**, das anstatt dem Chloracetoxy-Derivat eingesetzt wurde, erfolgte mit der Lipase PS jedoch hoch selektiv.

Die 1-*O*-Trityl-substituierten Verbindungen sind durch ihr einfaches Schutzgruppenprotokoll und ihre vorteilhaften sterischen Eigenschaften gut geeignete Substrate. Die mit Lipase PS katalysierte Veresterung von 3-(Aryloxy)-2-hydroxyacetat **13c** mit Vinylacetat in THF wurde ausführlich von Theil et al. untersucht.<sup>77</sup> Auf Grund des zu geringen Größenunterschieds zwischen den *O*-Aryl- und *O*-Acyl- Substituenten bei der Enzymerkennung konnte kein Umsatz festgestellt werden. Die 1-*O*-Trityl-substituierten Verbindungen **13d-f** wurden dagegen erfolgreich selektiv verestert.<sup>78,79</sup> Der Größenunterschied der Substituenten war sehr variabel, einerseits die große sperrige Trityloxy-Gruppe und andererseits das kleinere Chloratom (der Chlormethylen-Rest) bzw. eine aliphatische Kette ( $n=1, 2$ ).

### 3.4.3. Racematspaltung von 1-Trityloxy-3-buten-2-ol

Das enantiomerenreine 3-Buten-1,2-diol **17** ist durch seine multifunktionellen Eigenschaften ein sehr attraktiver C<sub>3</sub>-Baustein für die Herstellung von zahlreichen Zielverbindungen, wie z.B. Aminosuktern, HIV-Proteasen-Inhibitoren oder Cyclosporinen, oder auch für asymmetrische Synthesen von  $\beta$ -Blockern.<sup>56,57,76,77,80</sup> 1-Alkylamino-3-aryloxy-2-propanole stellen z.B. Vorstufen für eine Klasse von  $\beta$ -Blocker-Wirkstoffen dar, wobei nur das (*S*)-Enantiomer die gewünschte therapeutische Wirkung besitzt.<sup>81</sup>

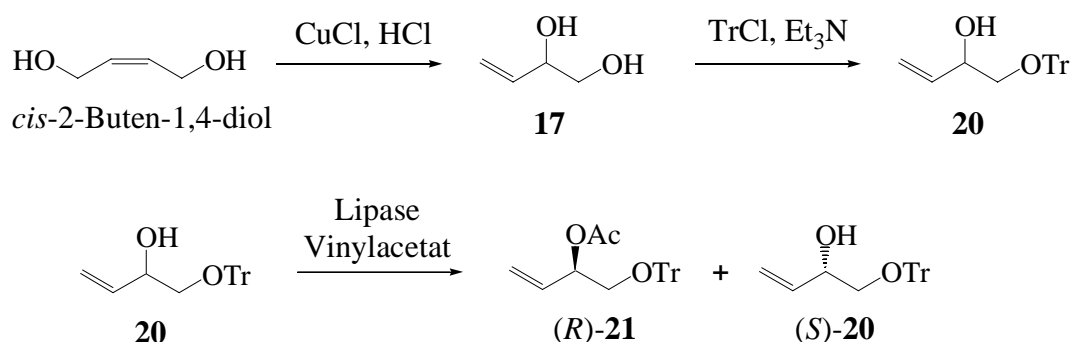
Das Diol **17** kann durch Wittig-Reaktion von (*S*)-Isopropylidenglyceraldehyd oder durch kinetisch kontrollierte Sharpless-Epoxidierung von 1-*O*-Acyl-geschützten 2-Hydroxy-buten **18a-b** (1-Tosyl- oder 1-Benzoyloxy-3-buten-2-ol) erhalten werden.<sup>76</sup> Durch den Einsatz von D- bzw. L-Diisopropyltartrat konnten gezielt beide Enantiomere mit Enantiomerenüberschüssen zwischen 85% und 99% erhalten werden.



**Abb. 3.13.** Sharpless-Epoxidierung von 1-*O*-acyl-geschützten 2-Hydroxy-buten **18a-b**

Die Frage der Reagenzkosten ist bei diesen asymmetrischen Synthesen sehr bedeutend, deshalb wird eine günstigere und effizientere Variante gesucht. Bei der Racematspaltung von Butendiol wurden verschiedene Schutzgruppen untersucht, die laut der „Kazlauskas-Regel“ sterisch anspruchsvoller als eine Doppelbindung sein sollten, um bessere Enantioselektivitäten zu erzielen.

In Rahmen dieser Arbeit wurde alternativ die aussichtsreiche Veresterung von 1-*O*-Tritylbuten-2-ol mit Vinylacetat untersucht. Ausgehend von *cis*-2-Buten-1,4-diol wurde dazu das 1,2-Diol **17** über saure Isomerisierung mit Kupferchlorid erhalten. Die anschließende Einführung der Trityl-Schutzgruppe ergab das an der primären Hydroxyfunktion geschützte Produkt **20** in 52 % Gesamtausbeute.<sup>82</sup>

Abb. 3.14. Veresterung von **20**

Für das Screening wurden Standardbedingungen mit dem Acyldonor als Solvens verwendet. 165 mg (0.5 mmol) Substrat **20** wurden in 1 mL Vinylacetat gelöst und mit 50 mg Lipase versetzt. Das Gemisch wurde 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt.

Mit den folgenden Enzymen wurde keine Umsetzung festgestellt:

Fluka	<i>Pseudomonas cepacia</i> (PS)
	<i>Candida cylindracea</i>
Amano	<i>Rhizopus oryzae</i> (FAP 15)
	<i>Aspergillus niger</i> (AP6)
	<i>Candida cylindracea</i> (AY 30)
	<i>Mucor javanicus</i> (M)
	<i>Rhizopus niveus</i> (N)
	AKG
	<i>Humicola lanuginosa</i> (PGE)
Serva	<i>Rhizopus</i>
Sigma	Lipase of wheat germ
Boehringer Enzyme Kit	L-2, L-3, L-5, L-7, L-8

Weitere Versuche mit der Lipase aus *Rhizopus* blieben ergebnislos, auch mit Cyclohexan oder *tert*-Butylmethylether als Cosolvens, oder mit größeren Mengen an Vinylacetat oder des Enzyms (bis 100 mg). Nur die Lipasen PS von Amano bzw. L-1, L-4 und L-6 von Boehringer M. zeigten interessante katalytische Aktivität.

Zur Bestimmung des Umsatzes konnte die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie verwendet werden, da die chemische Verschiebung des 2-H Protons an dem chiralen C-Atom des Alkohols und des Esters einen messbaren Unterschied aufweist. Die Enantiomerenüberschüsse wurden über chirale HPLC (Chiracel OD-H, Hexane/Isopropanol = 98:2) bestimmt.

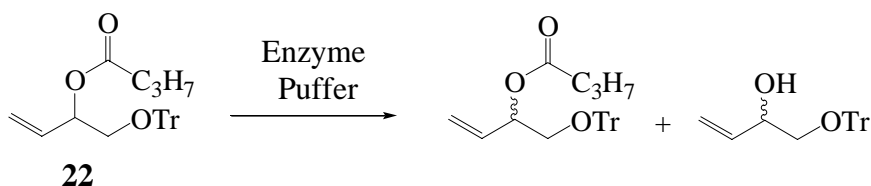
Lipasen	Umsatz /%	E	( <i>R</i> )- <b>21</b> <i>ee</i> / %	( <i>S</i> )- <b>20</b> <i>ee</i> / %
PS Amano	25	<100	94	34
L-1	46	200	95	>98
L-1 <sup>a</sup>	52	>200	95	>98
L-4 <sup>a</sup>	32	100	97	44
L-6 <sup>a</sup>	44	>200	98	76

<sup>a</sup> von Boehringer M. empfohlene Bedingungen (mit MTBE)

Mit der Lipase L-1 (Lipase PS) wurden bei einem Umsatz von 46% der Alkohol (*S*)-**20** mit einem *ee*-Wert von >98% und das Acetat (*R*)-**21** mit 95% *ee* erhalten. Der Wert des Enantiomerenverhältnisses ( $E > 200$ ) bestätigt den idealen Ablauf der enzymatischen Umsetzung.

Diese Strategie ließ sich auch auf einen präparativen Ansatz mit 1 g Substrat **20** anwenden, wobei 320 mg (70%, *ee* >98%) (*S*)-**20** und 300 mg (70%, 95% *ee*) (*R*)-**21** nach Chromatographie erhalten wurden.

Neben der Veresterung kann auch die Hydrolyse eine interessante Reaktion für die Racematspaltung sein. Die Hydrolyse des Butyrats **22** wurde daher mit den Lipasen PS und L-1 untersucht, jedoch ohne nennenswerten Umsatz beobachten zu können.



**Abb. 3.15.** Hydrolyse von 1-*O*-Trityl-2-*O*-butyratbuten **22**

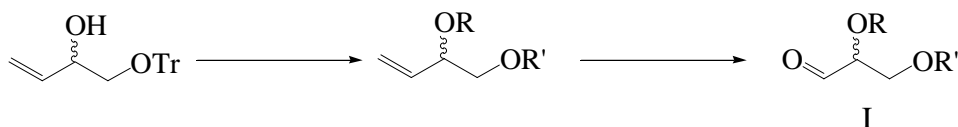


Die Löslichkeit von **22** im Reaktionsgemisch war vermutlich zu gering. Die Lösung aus 0.25 mmol **22**, 0.25 mL Toluol und in 2.5 mL Phosphatpuffer (pH 7.4) bildete eine sehr heterogene Emulsion, in der die Wechselwirkung zwischen dem Substrat und dem Enzym schwer stattfinden konnte.

### 3.5. Zusammenfassung

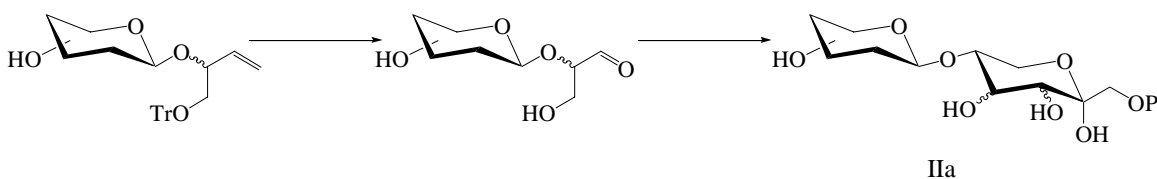
Die Veresterung von 1-*O*-Tritylbuten-2-ol **20** mit Vinylacetat stellte sich als eine leistungsvolle und effiziente Reaktion zur Gewinnung von enantiomerenreinen 1,2-Diolderivaten dar. Bei der Verwendung der Lipase L-1 (Lipase PS) wurden bei einem Umsatz von 46% der Alkohol (*S*)-**20** mit einem *ee*-Wert von >98% und das Acetat (*R*)-**21** mit 95% *ee* erhalten. Der Wert des Enantiomerenverhältnisses (*E*>200) bestätigt die hohe Selektivität dieser enzymatischen Umsetzung. Mit einem preiswerten Biokatalysator kann diese Synthese prinzipiell auch in Molmengen durchgeführt werden.

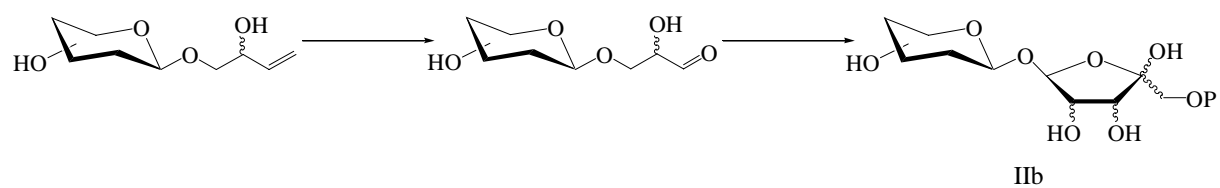
Aus dem enantiomerenreinen 1-*O*-Tritylbuten-2-ol **20** können variabel geschützte Derivate I von Glycerinaldehyd hergestellt werden, wenn die OH-Gruppe am chiralen Kohlenstoff geschützt und die Doppelbindung durch Ozonolyse zum Aldehyd oxidiert wird.



I stellt einen potentiellen Substrat für die DHAP-Aldoladdition dar. Solche Ausgangsverbindungen sind nützlich für die *de novo*-Synthese neuer Zucker.

**20** bietet auch einen Zugang zu *O*-Glucosiden IIa und IIb.<sup>30</sup> Die primäre bzw. sekundäre Hydroxyfunktion kann glycosyliert werden. Die Kettenverlängerung erfolgt nach Ozonolyse durch enzymkatalysierte DHAP-Aldoladdition, wobei die Aldoladdukte zu Furanosen bzw. Pyranosen cyclisieren.<sup>83</sup>





## 4. Tandem – Aldoladdition

Die Strategie der Tandem-Aldoladdition besteht aus einer Kettenverlängerung eines Dialdehyds durch doppelseitige Barbier-Allylierung des symmetrischen Edukts, Ozonolyse und anschließende enzymatische Aldoladdition. Alternativ wird ein symmetrisches Diketon nach der Barbier-Methode allyliert, dieses Allyladdukt dann durch Ozonolyse zum Aldehyd oxidiert und letzterer mit DHAP-Aldolasen weiter umgesetzt.

Bisher wurden nur lineare und einfache cyclische Systeme untersucht, wobei insbesondere die chemoenzymatische Synthese nicht-natürlicher Kohlenhydrate im Vordergrund stand.<sup>29,31</sup>

Die Allylierung von Carbonylverbindungen ist eine Grundreaktion in der organischen Synthese und viele effiziente Methoden wurden hierfür entwickelt.<sup>84</sup> Die C-C-Verknüpfung wird durch Organometall-Verbindungen vermittelt, wobei die meisten Reagenzien wie z.B. bei der Reformatsky- oder der Grignard-Reaktionen feuchtigkeitsempfindlich sind und damit eher umständlich zu handhaben. Bei der Verwendung von apolaren Solventien können geschützte Edukte eingesetzt werden, vor allem im Fall von polaren Substraten wie Alkoholen und Kohlenhydraten. Es besteht ein starkes Interesse an der Untersuchung von Reaktionen in polarem Lösungsmittel, vor allem bei der Verwendung von Wasser.<sup>85</sup>

Die Barbier-Typ-Reaktion bietet die Möglichkeit, eine Allylierung im wässrigen Milieu durchzuführen.<sup>86,87</sup> Die aktive Spezies wird aus dem elementaren Metall und der organischen Halogenverbindungen *in situ* gebildet. Die am häufigsten eingesetzten Metalle sind Zinn, Zink und Indium. Säure, Erwärmen oder Ultraschall sind oftmals erforderlich, um die Reaktion zu induzieren, wobei die Wirkung in der Erosion liegt und damit der kontinuierlichen Aktivierung der Metalloberfläche und in der Erhöhung der Kontaktflächen im Mehrphasensystem.

Da Ammoniumchlorid Zink ebenso aktiviert, wurden die Reaktionen zunächst nicht in Wasser, sondern in einer gesättigten Salzlösung durchgeführt. 1991 wurden zum erstenmal von Whitesides et al. ungeschützte Kohlenhydrate in eine ultraschall-induzierte Allylierung im Wasser-Ethanol-System mit Zinn für die Synthese höherer 2-Desoxyaldosen eingesetzt.<sup>88</sup>

In Abhängigkeit vom Metall kann es hierbei zu einer unerwünschten Reduktion der Carbonyl-Komponente und/oder einer Bildung von Pinakolen kommen. Je nach Allylhalogenid und Lösungsmittelsystem ist die Konkurrenz aus Dimerisierung, Protolyse, sowie Solvolyse in

Alkoholen unterschiedlich stark ausgeprägt. Daher werden bei der Allylierung meist sowohl das Allyläquivalent als auch das Metall überstöchiometrisch eingesetzt.

Die Barbier-Typ-Allylierung bietet folgende Vorteile:

- das Handhaben von wasserfreien Lösungsmitteln entfällt
- polare Gruppen können auch ungeschützt eingesetzt werden.

Aus dieser Allylierung werden 3-Hydroxyolefine erhalten, die potentielle Substrate für die Tandem-Aldoladdition darstellen.

Die folgende Studie betrifft bicyclische Gerüste mit unterschiedlicher Symmetrie wie das  $C_2$ -symmetrische Bicyclo[2.2.1]heptan, das  $C_{2v}$ -symmetrische Bicyclo[3.3.0]octan und aromatische Systeme. Der Ansatz mit solchen „exotischen“ Substraten stellt die Möglichkeit dar, die Substrattoleranz der Aldolasen für komplexe sterisch anspruchsvolle Substrate sowie für die Einsatzbreite in bidirektionalen Synthesen zu prüfen.

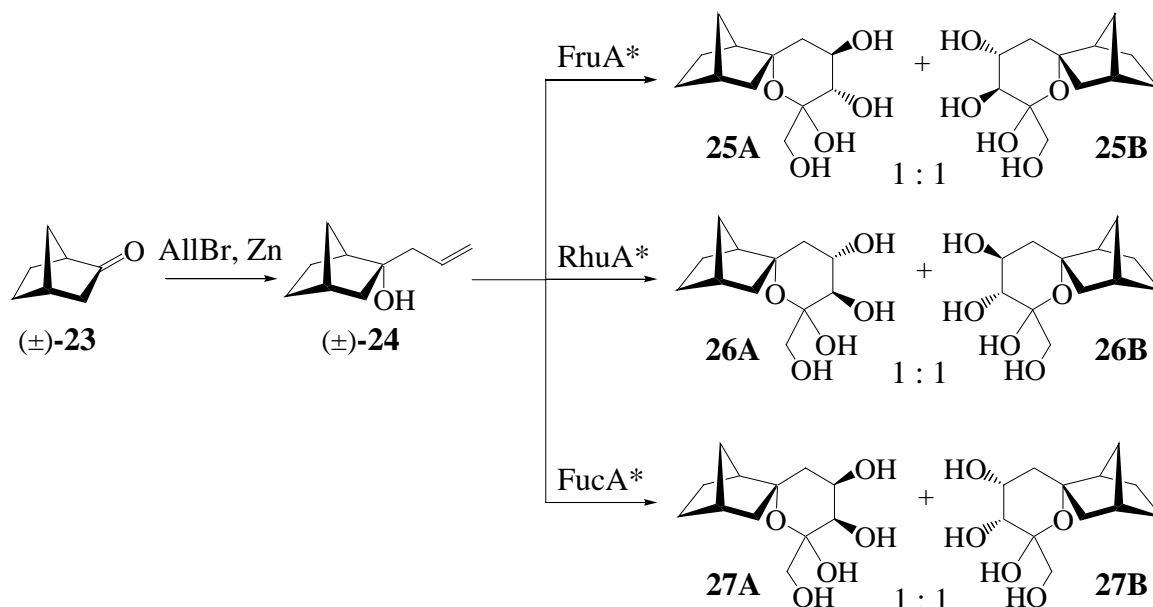
#### 4.1. Synthese von *Spiro*-Saccharidmimetika mit Norbornangerüst

##### 4.1.1. Modellstudie : Chemo-enzymatische „Spiroglycosylierung“ aus Norcampher

Der Norcampher **23** ist ein sterisch anspruchsvoller Bicyclus ohne Symmetrieelemente und damit ein strukturell interessantes (potentielles exotisches) Substrat für die Aldolasen.

Als Modellstudie wurde das kommerziell verfügbare Monoketon **23** zunächst in einer monodirektionalen Synthese eingesetzt (Abb. 4.1). Die Barbier-Allylierung von **23** ergab mit 84% Ausbeute das racemische 2-Allyl-2-*endo*-norbornanol **24**. Hierbei wurde kein *exo*-Isomer isoliert. Das *endo*-Isomer wird vermutlich aus sterischen Gründen durch einen *exo*-Angriff des Nukleophils bevorzugt gebildet. Die Ozonolyse des Olefins **24** wurde in Methanol bei -80°C durchgeführt und der Verlauf der Reaktion durch Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Gemisch reduktiv durch Zugabe von Dimethylsulfid aufgearbeitet und langsam auf RT erwärmt. Hierauf wurden Methanol und Formaldehyd im Vakuum entfernt. Die Aldehyd-Lösung enthielt laut NMR-Untersuchungen hauptsächlich den freien Aldehyd als Hydrat. Der Aldehyd wurde ohne chromatographische Reinigung direkt in wässriger Lösung weiter umgesetzt. Das Gemisch blieb auch nach der Einstellung des pH-

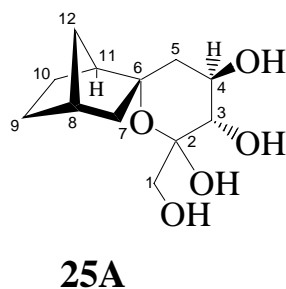
Wertes auf 6.8-7.0 klar. Außerdem wurde keine Bildung von Acetalen oder Oligomeren festgestellt, welche eventuell ausfallen könnten.



**Abb. 4.1.** Aldoladdition aus Norcampher **23**

Zu der konzentrierten Aldehyd-Lösung (5 mmol) wurden zweimal im Abstand von 18 Stunden jeweils 3 mmol (0.6 Äq.) einer DHAP-Lösung und 200 U einer Aldolase-Lösung zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von Aktivkohle abgebrochen. Das Ketosephosphat wurde nicht aufgereinigt, sondern zunächst mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, wobei die entsprechenden freien Pyranosen entstanden.

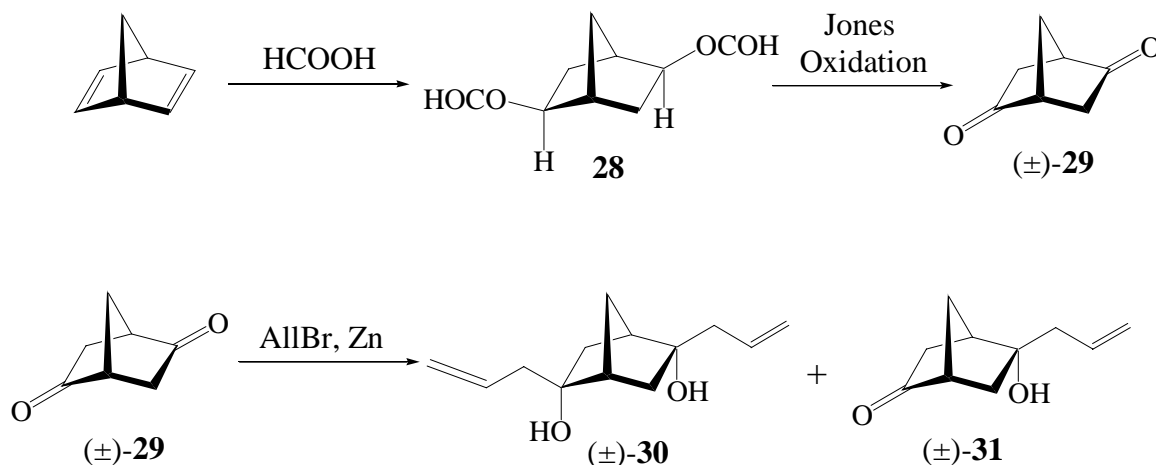
Die Aldoladdition mit FruA, RhuA und FucA lieferte die entsprechenden Aldoladdukte **25**, **26** und **27**, jeweils als Gemisch von 2 Diastereoisomeren. Die Konfigurationen der Hydroxy-Gruppen wurden dabei von der Aldolase festgelegt:  $3S,4R$  mit der FruA,  $3R,4S$  mit der RhuA,  $3R,4R$  mit der FucA. Das Verhältnis der Stereoisomeren (1:1), begründet in der inneren Konfiguration des Spirozenters durch Verwendung der racemischen Ausgangskomponente, wurde durch  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie bestätigt: Die Verschiebungen der Protonen H-4 für jedes Stereoisomere A und B lagen bei 4 ppm als zwei übereinanderliegende symmetrische Triplet-Dublet-Dublet-Signale (tdd, Dach-Effekt) vor. Die Verschiebung des Protons H-11 für das Stereoisomere A lag bei 2.6 ppm (Dublet). Ausführliche NMR-Untersuchungen (500 Mhz, NOE Differenz- und Entkopplungsmessungen) wurden für die FruA-Addukte vorgenommen, so dass eine genaue Zuordnung für jedes Stereoisomer möglich wurde.



Die FruA- und RhuA-Addukte wurden über drei Reaktionschritte mit 34% bzw. 33% Gesamtausbeute erhalten. Die FucA-Addukte wurden nur in 17% Ausbeute erhalten, vermutlich weil die Substrattoleranz von FucA stärker begrenzt ist und kein vollständiger Umsatz erreicht wurde.

#### 4.1.2. Chemo-enzymatische Tandem-Aldoladdition mit dem C<sub>2</sub>-symmetrischen Norbornan-2,5-dion

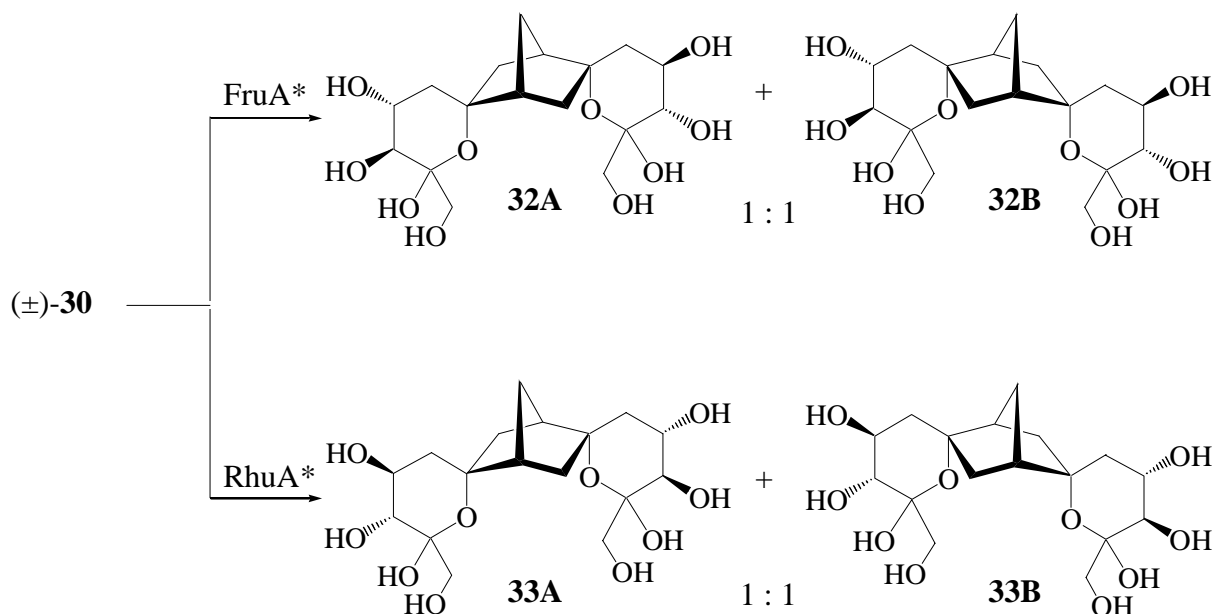
Das C<sub>2</sub>-symmetrische Norbornandion **29** wurde durch säurekatalysierte Formylierung und Jones-Oxidation aus Norbornandien hergestellt (37% Gesamtausbeute).<sup>89-91</sup> Die Allylierung lieferte mit 35% das Diallyladdukt (±)-**30** neben ca. 14% des Monoaddukts (±)-**31**.



**Abb. 4.2.** Synthese von Norbornan-2,5-dion **29** und dessen Allylierung

Das erhaltene Diallyladdukt (±)-**30** wurde wie unter 4.1.1. beschrieben weiter umgesetzt. Die Tandem-Aldoladdition mit dem C<sub>2</sub>-symmetrischen (±)-**30** verlief nur mit FruA und RhuA

erfolgreich. Die FruA- und RhuA-Addukte wurden mit 18% bzw. 12% Gesamtausbeute erhalten. Es wurde kein FucA-Bisaddukt isoliert, vermutlich weil phosphorylierte Verbindungen wie das intermediäre Monoaddukt im Allgemeinen schlechte Substrate für die FucA sind.<sup>92</sup>



**Abb. 4.3.** Tandem-Aldoladdition aus **30**

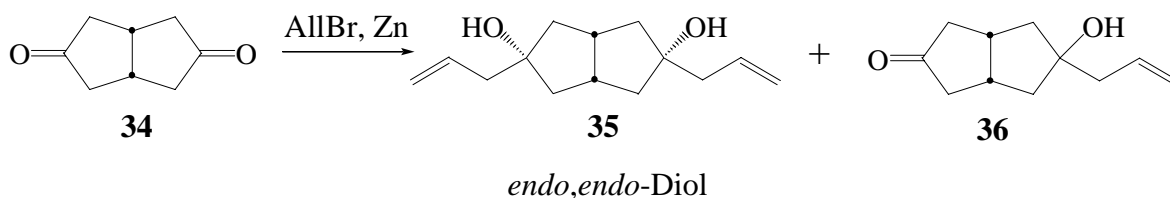
Die Ausbeuten der Bisaddukte sind im Vergleich zu den Ausbeuten der Monoaddukte geringer, wobei dies eventuell auf die sterische Hinderung einer solch komplexen Struktur (Norbornangerüst, *spiro*-Kohlenstoff) und die begrenzte Stabilität von DHAP bei längeren Reaktionszeiten zurückzuführen ist. Dazu ist die Substrattoleranz der Aldolasen gegenüber solchen exotischen Edukten begrenzt. Die hoch polare Natur der Addukte macht ihre Isolierung und Aufreinigung zusätzlich schwierig.

## 4.2. Synthese von *Spiro*-Saccharidmimetika aus Bicyclo[3.3.0]octan-3,7-dion

Das Bicyclo[3.3.0]octan-3,7-dion **34** ist ein Bicyclus mit einer planaren Symmetrie ( $C_{2v}$ ), d.h. es besitzt ein anderes Muster als das Norbornangerüst.

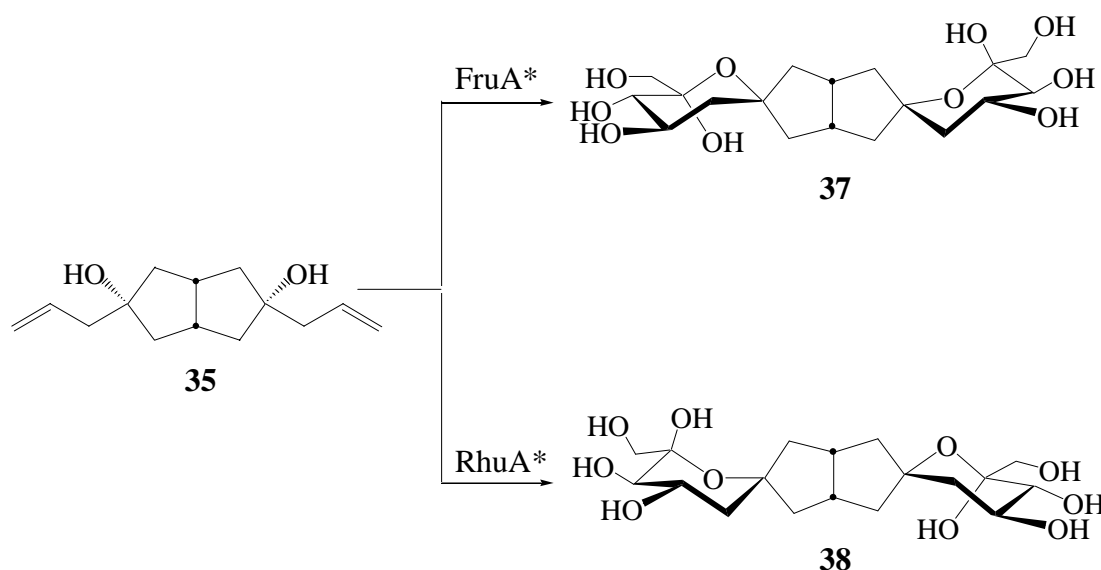
Der Bicyclus **34** kann aus Glyoxal und Dimethyl-3-oxo-1,5-pentanoat hergestellt werden.

Die Allylierung von **34** erfolgte problemlos in 63% Ausbeute zu dem *endo,endo*-3,7-Diallylbicyclo[3.3.0]octan-3,7-diol **35** neben 37% an dem 3-Allyl-3-Hydroxybicyclo[3.3.0]octan-7-on **36**. Der *exo*-Angriff wurde aus sterischen Gründen bevorzugt. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohprodukts konnte kein anderes Isomer nachgewiesen werden.



**Abb. 4.4.** Allylierung von Bicyclo[3.3.0]octan-3,7-dion **34**

Die weitere Umsetzungen, Ozonolyse, Aldoladdition und Dephosphorylierung erfolgte unter denselben Bedingungen wie oben beschrieben und ergaben die gewünschten Bisaddukte **37** mit FruA, bzw. **38** mit RhuA. Auf Grund der  $\text{C}_2$ -Symmetrie der Addukte traten keine Diastereoisomerengemische wie bei der Verbindung **30** auf.



**Abb. 4.5.** Tandem-Aldoladdition aus **35**

Die niedrigeren Ausbeute (10 % mit FruA und 8% mit RhuA) weisen darauf hin, dass die sterische Hinderung der enzymatischen Addition bedeutend sein muß. Es wurde auch wiederum kein Addukt mit FucA isoliert.



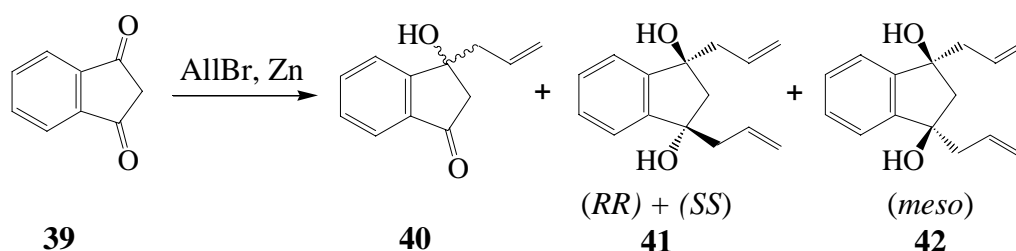
Bei diesen Addukten stellt der 3-Hydroxyaldehyd zwar eine relativ flexible Kette dar, die eine geeignete Position in dem aktiven Zentrum der Aldolase finden kann. Der sterische Anspruch des aliphatischen Gerüsts und die im Intermediär auftretenden Monoaddukt zusätzlich zu adaptierende Zuckereinheit, mit potentieller Beeinträchtigung der aktiven Enzym-Konformation, können die geringe Ausbeute erklären.

### 4.3. Synthese von aromatischen *Spiro*-Saccharidmimetika

Als unnatürliche und unpolare Substrate sind aromatische Verbindungen im Allgemeinen schlechte Edukte für die durch DHAP-Aldolasen katalysierte Aldoladdition.<sup>25</sup> Das Indan-Gerüst bietet aber interessante Möglichkeiten, um Spiroverbindungen zu erhalten, z.B. aus den entsprechenden Ketonderivaten. Das kommerziell erhältliche 1,3-Indandion ( $C_{2v}$ -symmetrisch) stellt ein potentielles Substrat für eine Tandem-Aldoladdition dar.

#### 4.3.1. Tandem-Aldoladdition aus 1,3-Indandion

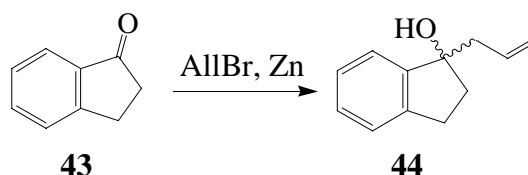
Die Barbier-Allylierung von 1,3-Indandion **39** lieferte nach einer chromatographischen Trennung das monoallylierte Addukt **40** (30%) und die gesuchten diallylierten Produkte, wobei das racemische Gemisch **41** (44%) und die *meso*-Verbindung **42** (20%) chromatographisch getrennt werden konnten.



**Abb. 4.6.** Allylierung von 1,3-Indandion **39**

Alle Versuche, eine enzymatische Aldoladdition mit den jeweiligen Komponenten als Edukt durchzuführen, blieben jedoch erfolglos. Da die Ursache unklar war und möglicherweise alleine die räumliche Nähe des starren Aromaten unverträglich war, wurde modellhaft

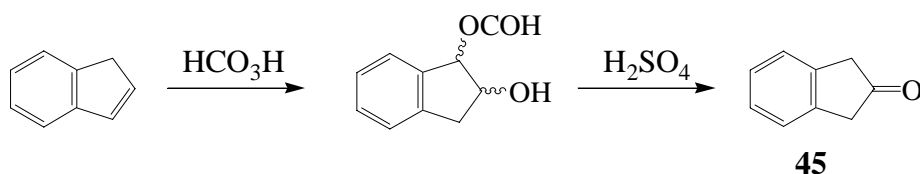
zunächst die Verbindung **44** als alternatives Substrat mit gleichem Gerüst aus dem monofunktionalisierten 1-Indanon untersucht.



Die Barbier-Allylierung von 1-Indanon **43** erfolgte mit 88% Ausbeute. Auch in diesem Fall erwies sich die Aldoladdition als sehr schwierig, so dass trotz langer Reaktionszeiten und DHAP-Überschuß kein Addukt isoliert werden konnte.

#### 4.3.2. Aldoladdition aus 2-Indanon

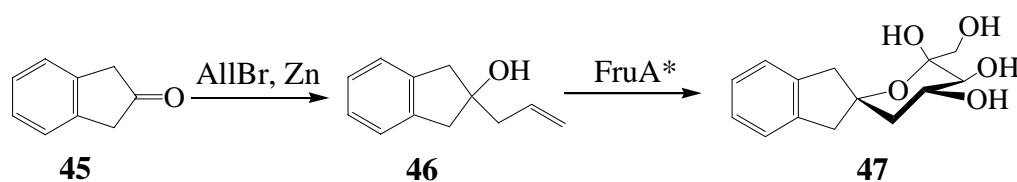
Nachdem eine *spiro*-Verknüpfung neben dem Aromaten nicht erreichbar schien, wurde versucht, das Isomere 2-Indanon **45** als Vorstufe zu nutzen. Diese monofunktionalisierte und symmetrische Verbindung stellt eventuell ein besseres Substrat für die Aldolase dar, weil die geometrischen Verhältnisse eher denen von **34** ähneln.



**Abb. 4.7.** Synthese von 2-Indanon **45**

Die Synthese von **45** erfolgte aus Inden mit 68% Ausbeute.<sup>93,94</sup> Die Schwierigkeiten lagen in der Luft- und Temperaturempfindlichkeit von **45** bei Raumtemperatur und in der Abtrennung des stabileren Isomers, 1-Indanon **43**.

Die Allylierung nach Barbier mit Zink lieferte quantitativ das prochirale Produkt **46**. Die Ozonolyse in Methanol lieferte nach der reduktiven Aufarbeitung des Ozonides mit Dimethylsulfid eine klare, leicht saure Lösung des 3-Hydroxyaldehyds als Gemisch aus freiem Aldehyd, Hydrat und Methylacetal.

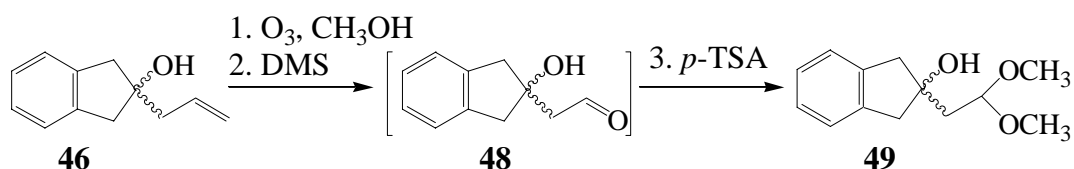


**Abb. 4.8.** Aldoladdition aus 2-Indanon **45**

Die Aufarbeitung der methanolischen Lösung durch Zugabe von Wasser, gefolgt von partiellem Einengen, um Methanol und Formaldehyd zu entfernen, wurde vorsichtig durchgeführt. Der erhaltene 3-Hydroxyaldehyd ist in konzentrierter wässriger Lösung sehr instabil, da leicht Eliminierungsprodukte sowie Dimere und gemischte höhere Acetale gebildet werden, die ausfallen und eine enzymatische Umsetzung verhindern können. Laut Dünnschichtchromatographie konnte in Gegenwart von DHAP und FruA die Bildung eines phosphorylierten Adduktes festgestellt werden. Nach der Aufarbeitung mit Anionen- und Kationentauscher konnte jedoch nur 1 % des gesuchten Spirozuckers **47** isoliert werden.

Um in weiteren Reaktionen die Ausbeute zu verbessern, wurde die Reaktionsführung modifiziert. Eine erste Variation beinhaltete die Zugabe von 10% Methanol zu der wässrigen Aldehyd-Lösung (1 mM), die zunächst kein besseres Ergebnis lieferte. Es wurde deshalb auf verschiedenen Wegen versucht, die Löslichkeit des freien Aldehyds zu verbessern: Isolierung des Aldehyds als Acetal gefolgt von kontrollierter Freisetzung durch saure Hydrolyse, oder durch Modifikation mittels Zugabe von Tris-Puffer bei der enzymatischen Aldoladdition sowie Zugabe von Cyclodextrinen.

a) Syntheseweg mit Isolierung des Aldehyds als Acetal

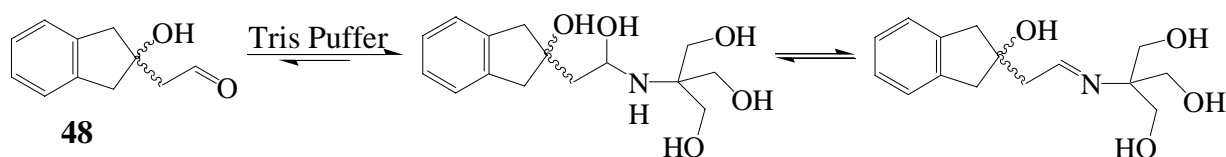


**Abb. 4.9.** Synthese des Acetals aus **46**

Das Acetal ist gegenüber dem Aldehyd eine stabilere Verbindung, aus welcher der Aldehyd unter schonenden Bedingungen in Wasser freigesetzt werden kann. Die Verwendung von Kationentauscher Amberlyst 15 in Methanol zur Acetylierung bei Raumtemperatur oder auch unter Rückfluß führte nicht zum gewünschten Acetal. **49** wurde aus einer Eintopfstufe mittels Ozonolyse erhalten (Abb. 4.9), wobei nach der reduktiven Aufarbeitung des Ozonides mit Dimethylsulfid *p*-Toluolsulfonsäure in katalytischer Menge zu dem Reaktionsgemisch gegeben wurde. Der Umsatz war nach 4 Stunden bei Raumtemperatur vollständig. Das Acetal **49** wurde nach Chromatographie in einer Ausbeute von 90% erhalten, wobei alle Verunreinigungen (DMSO, Formaldehyd) aus der Ozonolyse entfernt werden konnten. Die Hydrolyse von **49** erfolgte in Wasser mit Kationentauscher (Dowex) und ergab eine leicht getrübe Lösung (~ 0.04 M), eine Suspension aus dem gelösten Aldehyd und seinem unlöslichen Dimer. Laut NMR-Spektrum lag 40% freier Aldehyd in der Suspension vor. In dem enzymatischen Ansatz trübte sich das Reaktionsgemisch zunehmend. Eine NMR-Untersuchung des isolierten Feststoffes lieferte allerdings kein interpretierbares Spektrum. Vermutlich handelte es um ein Kupplungsprodukt mit dem Enzym oder um Oligomere des Aldehyds. Weiterhin wurde eine Verbesserung der Arbeitsvorschrift bei der Isolierung des Rohproduktes. Nach der enzymatischen Adoladdition wurden die Enzyme nicht mit Aktivkohle entfernt, sondern nur durch Filtration an Kieselgur. Die unpolare Eigenschaft des Indan-Gerüsts wurde nach der Dephosphorylierung genutzt, um das Produkt aus dem Reaktionsgemisch durch Extraktion mit Ethylacetat und durch Sättigung der wässrigen Phase mit Natriumchlorid zu isolieren. Die FruA-katalysierte Aldoladdition lieferte das Addukt **47** jedoch insgesamt in einer verbesserten Ausbeute von immerhin 11%.

#### b) Aldoladdition in Tris-Puffer<sup>95</sup>

Die methanolische Lösung des Aldehyds **48** aus der Ozonolyse wurde mit Tris-HCl-Puffer (20-60 mMol. pH = 6.9) aufgearbeitet, so dass von der Einstellung eines Gleichgewichts zwischen dem freien Aldehyd und dem entsprechenden Halbaminal oder Imin (Schiffsche-Base) auszugehen war. Das Imin stellt gegenüber dem Aldehyd ein stabiles und polareres Derivat dar. Durch die Gleichgewichtsreaktion in Tris-Puffer steht der Aldehyd weiterhin für die Aldoladdition zu Verfügung.



Der Ansatz wurde ansonsten wie üblich nach AVV-2-3-4 verarbeitet. Das noch am Anfang klare Reaktionsgemisch wurde nach 24 Stunden zunehmend trüb. Das Addukt **47** konnte allerdings in einer Ausbeute von 14% isoliert werden.

#### c) Verwendung von Cyclodextrinen

In den letzten Jahren haben Cyclodextrine immer breitere Anwendungen gefunden.<sup>96</sup> Sie stellen einen attraktiven Weg dar, um in wässrigem Milieu und auch in Gegenwart von Enzymen durch die Bildung eines Komplexes die Löslichkeit des Substrats zu verbessern.<sup>97-99</sup> Hierfür wurden immer neuere, gezielt substituierte Cyclodextrine entwickelt.

Das symmetrische Gerüst von 2-Indanon **45** sollte ein gutes Substrat für  $\beta$ -Cyclodextrine sein. Die Kavität von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrinen sollte zu klein bzw. zu groß sein. Bei der Hydrolyse des Acetals **49** wurde  $\beta$ -Cyclodextrin zugegeben, jedoch konnte nach der vollständigen Aufarbeitung dieses Ansatzes keine effektive Verbesserung festgestellt werden. Im Vergleich zu dem allylierten 2-Indanon **45** ist die Aldehyd-Funktion durch eine relativ flexible C-4-Kette von dem hydrophoben Teil entfernt, so dass die Wechselwirkungen zwischen dem aktiven Zentrum des Enzyms und des Cyclodextrins eigentlich gering sein sollten. Der Versuch, Cyclodextrine schon bei der Ozonolyse zuzugeben, scheiterte an ihrer geringen Löslichkeit im organischen Solvens. Die Verwendung von substituierten Cyclodextrinen wie 2-Hydroxypropyl-cyclodextrin könnte aber eine bessere Alternative durch deren höheren Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln darstellen.

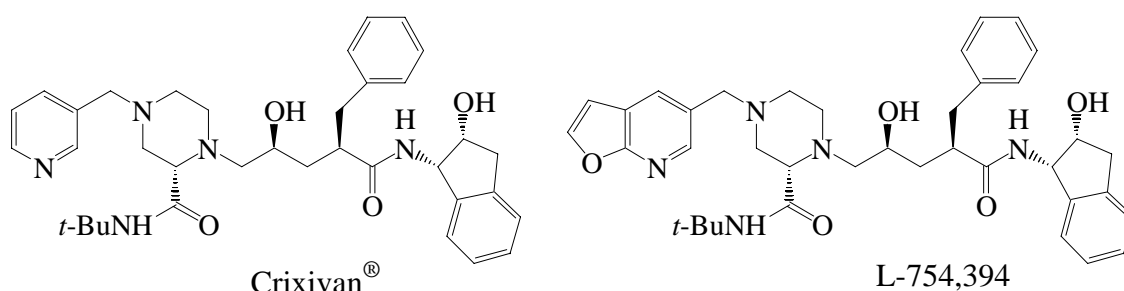
#### 4.4. Zusammenfassung

Die Studien der Substrate mit dem Norbornan- und dem Bicyclo[3.3.0]octan-Gerüst zeigten, dass die enzymatische Tandem-Aldoladdition einen relativ einfachen Zugang zu neuen und strukturell bemerkenswerten *Spiro*-Saccharidmimetika ermöglicht, wenn auch die Ausbeute verbesserungsbedürftig erscheinen.

Die durch DHAP-Aldolasen katalysierte Tandem-Aldoladdition von aromatischen Verbindungen mit dem Indan-Gerüst erwies sich dagegen als unerwartet schwierig, hauptsächlich wegen ihres sterisch hohen Anspruch sowie den hydrophoben Eigenschaften. Die Zugabe von modifizierten Cyclodextrinen, die Benutzung anderer Aldolasen oder die Zugabe von Cosolventien könnten eventuell eine Verbesserung erlauben.

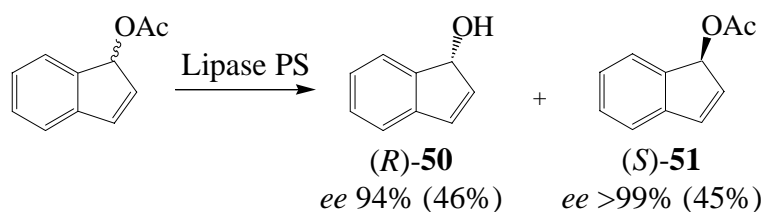
## Synthese von 1-Indenol

1-Indenol **50** ist als chiraler sekundärer Alkohol ein attraktiver Baustein für die Synthese von Naturstoffen und Arzneimitteln. Diese Verbindung wird als Vorstufe in der Synthese von verschiedenen chiralen Aminoindanolen<sup>100,101</sup> eingesetzt, wie z.B. bei der Synthese der HIV1-Proteaseinhibitoren, wie Crixivan® (L-735,524, Indinavir™, MK 639) und L-754,394 (Abb. 5.1).<sup>102-105</sup>



**Abb. 5.1.** HIV1-Proteaseinhibitoren

In den genannten Proteaseninhibitoren wird Indenol als enantiomerenreine Verbindung eingesetzt. Die Enantiomeren von **50** sind durch eine Racematspaltung oder eine mikrobielle Oxidation zugänglich.<sup>106-109</sup> (*R*)-**50** wurde durch Racematspaltung bei der Hydrolyse des racemischen Acetates mit dem Mikroorganismus *Rhizopus nigricans* erhalten.<sup>106</sup> Diese mikrobielle Hydrolyse lieferte das (*R*)-Indenol (*R*)-**50** mit 97% *ee* und 44% Ausbeute. Ogasawara et al. haben die Racematspaltung unter Verwendung der Lipase PS durchgeführt, wobei die entsprechenden Produkte durch Acetylierung mit 22% *ee* zurückgewonnen wurden.<sup>107</sup> Effizienter ist die Racematspaltung durch Hydrolyse des 1-Acetoxyindens: (*S*)-**51** wurde mit >99% *ee* in 45% Ausbeute zurückgewonnen und das (*R*)-Indenol mit 94% *ee* und 46% Ausbeute (Abb. 5.2).

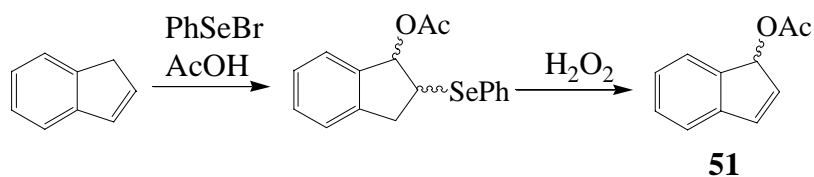


**Abb. 5.2.** Racematspaltung von Acetoxyinden **51** durch Hydrolyse

Bei der Hydrolyse von (*S*)-**51** in Methanol wurde das Enantiomer (*S*)-**50** in 70% Ausbeute, aber auch sein Isomerierungsprodukt, das 1-Indanon (19%) erhalten.

Außerdem haben Studien mit Dioxygenasen gezeigt, dass die Oxidation von Indan und von Inden unter anderem (*S*)- und (*R*)-Indenol liefern kann.<sup>101,110</sup> (*S*)-**50** wurde aus Indan und Inden mit der gereinigten Naphthalindioxygenase aus *Pseudomonas sp.* oder aus den entsprechenden mutierten und rekombinanten Stämmen erhalten und (*R*)-**50** aus Inden mit dem *Pyricularia zingiberi* fungus.<sup>109</sup>

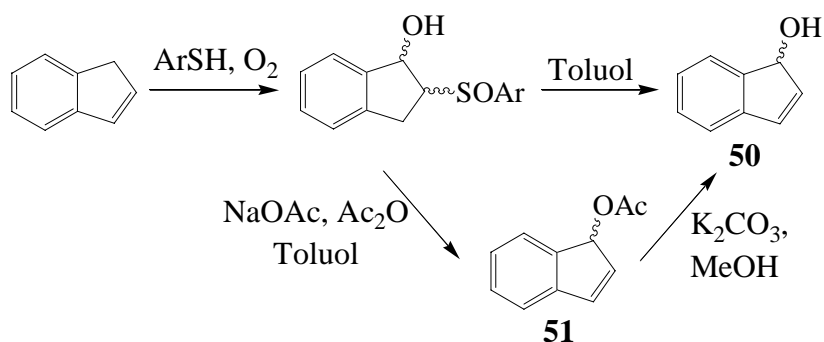
In der Literatur wird von zwei Synthesewegen zu dem racemischen Indenol **50** bzw. dem Acetoxyinden **51** berichtet. Ito et al. haben eine Synthese über selenorganische Zwischenstufen vorgestellt.<sup>106</sup> Mittels Addition von Phenylselenid an Inden wurde das 1-Hydroxy-2-phenylselenidindan hergestellt, welches *in situ* acetyliert wurde (Abb. 5.3). Diese Organoselenverbindung wurde mit Wasserstoffperoxid zu dem entsprechenden Selenoxid oxidiert, dessen Eliminierung dann das 1-Acetoxyinden **51** ergab.



**Abb. 5.3.** Synthese von **51** nach Ito et al.

Der andere Weg beruht auf der Cooxidation von Inden mit *p*-Chlorthiophenol zu einem Isomerengemisch von 2-(*p*-Chlorphenylsulfinyl)-1-indenol, und anschließender Eliminierung (Abb. 5.4).<sup>111</sup> Die Cooxidation verlief quantitativ, die Eliminierung zu **50** in Toluol hingegen nur in 40% Ausbeute.



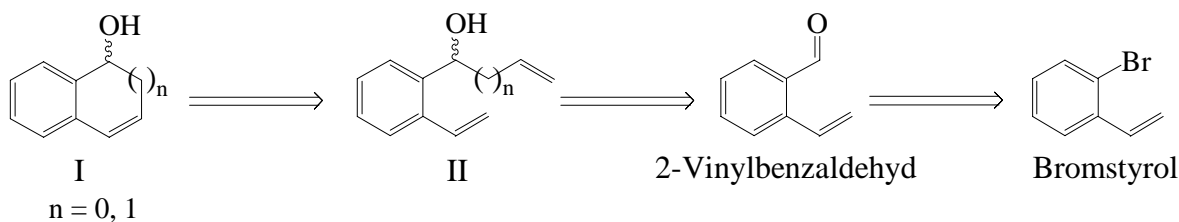


**Abb. 5.4.** Synthese von **50** nach Szmant et al.

Um die Handhabung des toxischen Selenids zu vermeiden, wurde die Methode der Cooxidation für die Synthese von **50** ausgewählt. Die in der Literatur genannten Ergebnisse waren jedoch nicht reproduzierbar. Für die Cooxidation wurde eine Ausbeute von 40% erst nach einer Reaktionsdauer von 7 Tagen unter Luftsauerstoff erreicht. Selbst bei Verwendung von reinem Sauerstoff wurde die Ausbeute nur auf 60% verbessert. Als Nebenprodukt wurde das 2-*p*-Chlorphenylsulfinylindan isoliert. Die folgende direkte Sulfinyl-Eliminierung in Toluol unter Rückfluß führte nur in 10% Ausbeute zum 1-Indenol **50**, während die Eliminierung zu dem stabileren 1-Acetoxyinden **51** hingegen quantitativ verlief. Durch dessen Hydrolyse wurde **50** in 50% Ausbeute erhalten.

Indenol **50** ist als Enol eine relativ instabile Verbindung, die in basischem Milieu zum 1-Indanon isomerisiert. Die Ringschlussmetathese bietet durch die milden Reaktionsbedingungen eine plausible Chance, **50** in einer besseren Ausbeute herzustellen.

Retrosynthetisch wurde folgender Reaktionssequenz für die Synthese von **50** ( $n=0$ ) oder von 1-Hydroxy-1,2-dihydronaphthalin ( $n=1$ ) vorgeschlagen. Die Zielverbindung I kann durch Ringschlussmetathese aus dem Diolefin II hergestellt werden. II wäre durch Vinylierung ( $n=0$ ) oder Allylierung ( $n=1$ ) von 2-Vinylbenzaldehyd zu erhalten, das durch Formylierung aus Bromstyrol synthetisierbar scheint.

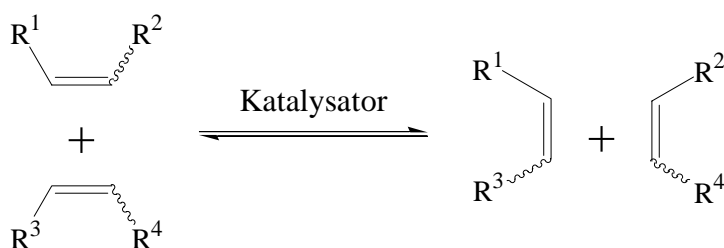


**Abb. 5.5.** Retrosynthetischer Weg durch Ringschlussmetathese

## 5. Ringschlussmetathese mit Substraten, die freien Hydroxylgruppen enthalten

### 5.1. Die Metathesereaktion

Unter Metathesereaktion versteht man den metallkatalysierten Austausch der Alkylidengruppen zweier Olefine, was eine interessante Methode zur C-C Verknüpfung darstellt.

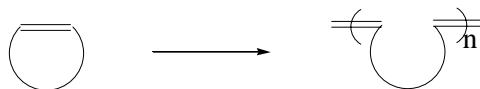


**Abb. 5.6.** Das Prinzip der Olefinmetathese

Ihren Ursprung nahm sie Mitte der 50er Jahre, als sie für die Ringöffnungspolymerisation entwickelt wurde. Mit der Entwicklung von neuen und effizienten Katalysatoren erwies sich die Olefinmetathese als eine vielseitige Reaktion, die zunehmend neuen präparativen Herausforderungen gerecht wird.<sup>112-116</sup>

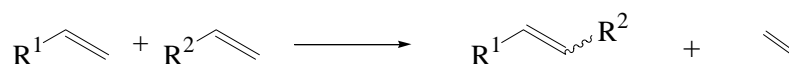
Es gibt drei grundlegende Reaktionstypen der Olefinmetathese:

1. Die Ringöffnungsmetathesepolymerisation (ROMP)



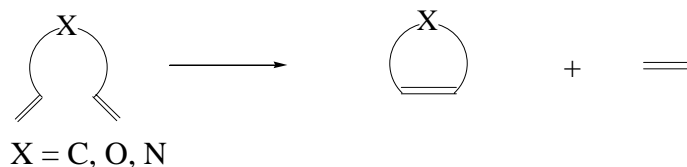
Die ROMP ist für gespannte Ringe wie 3-, 4-, 8-Ringe oder größere Cyclen thermodynamisch begünstigt.

2. Die acyclische gekreuzte Metathese (CM)



Bei der acyclischen gekreuzten Metathese (CM) reagieren zwei unterschiedliche substituierte terminale Olefine miteinander. Die intermolekulare Olefinmetathese ist eine interessante Alternative zur RCM, wenn es gelingt, höhere Ausbeute und bessere Regio- und Stereoselektivität zu erzielen.

3. Die Ringschlussmetathese (RCM)

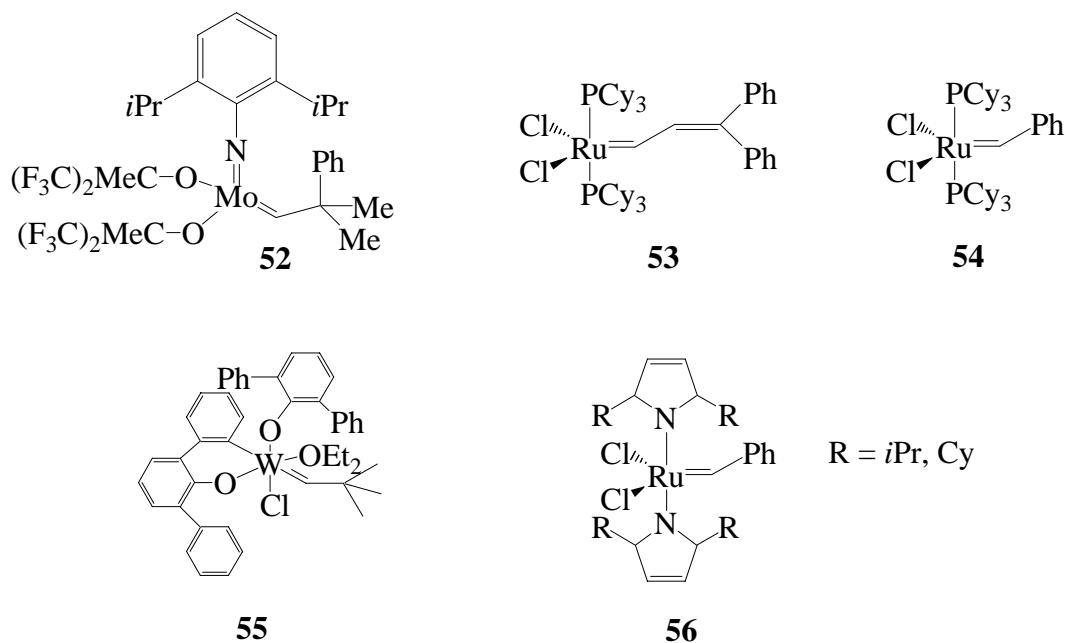


Seit Anfang der neunziger Jahren besteht ein sehr großes Interesse an der Ringschlussmetathese, besonders um mittlere oder große Ringe aus acyclischen Olefinen herzustellen. Dabei wurden neue Katalysatoren entwickelt, die eine hohe Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen aufweisen und daher gegenüber vielen unterschiedlichen Substraten aktiv bleiben. Diese Reaktion hat den großen Vorteil, dass außer dem Katalysator keine zusätzlichen Reagenzien benötigt werden und meistens ein flüchtiges Olefin, z. B. Ethylen, als einziges Nebenprodukt entsteht.

### 5.1.1. Die Katalysatoren

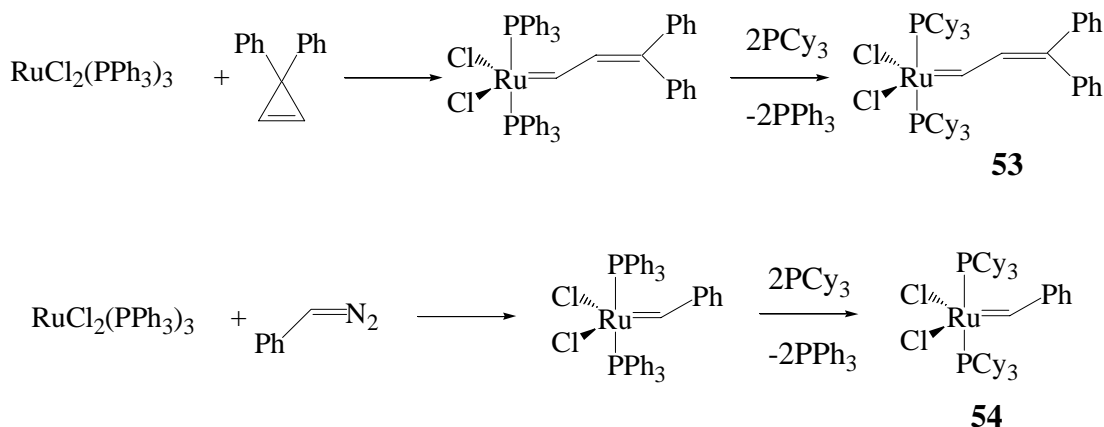
Die Entwicklung der Metathese-Katalysatoren wurde in zahlreichen Übersichtsartikeln dokumentiert.<sup>112,116-118</sup> Erste Studien wurden mit „undefinierten“ Systemen durchgeführt. Diese enthielten mehrere Komponenten wie Übergangsmetallsalze oder -komplexe und metallorganische Verbindungen, wobei *in situ* eine katalytisch aktive Spezies erzeugt wird. Mechanistische Details sowie die Struktur der aktiven Spezies sind aber nicht bekannt. Erst Anfang der neunziger Jahre wurden „definierte“ Metallcarbenkomplexe hergestellt. Typischerweise werden hier Molybdän oder Ruthenium als Komplexzentren eingesetzt (Abb. 5.7). Im Gegensatz zu den undefinierten Systemen wird keine Lewis-Säure als Cokatalysator oder Promotor benötigt.

Einer der ersten von Schrock und Mitarbeitern entwickelte definierte Katalysator ist der Alkoxyimidomolybdänkomplex **52**.<sup>119</sup> Dieser besitzt ein sehr breites Substratspektrum, das unterschiedlichste Verbindungen umfasst. Je nach Substrat kann man dazu die Alkoxide variieren, um das beste katalytische System herzustellen. Der Katalysator hat jedoch große Nachteile: er zeigt geringe Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen und ist thermisch instabil, luft- und feuchtigkeitsempfindlich.



**Abb. 5.7.** Ausgewählte stabile Metathesekatalysatoren

Die Systeme **53** und **54** aus Ruthenium wurden ebenfalls von Grubbs und Mitarbeitern vorgestellt. Der Rutheniumvinylidenkomplex **53** ist aus der Reaktion zwischen  $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$  mit 3,3-Diphenylcyclopropen und darauffolgendem Ligandenaustausch durch Tricyclohexylphosphan zugänglich.<sup>120</sup> Der strukturell verwandte Rutheniumbenzylidencarbenkomplex **54** wurde mit Phenyldiazomethan anstatt Cyclopropen hergestellt (Abb. 5.8).<sup>121</sup>



**Abb. 5.8.**        Synthese von Ruthenium-Komplexen

Die Ruthenium-Carben-Systeme **53** und vor allem **54** haben breite Verwendung gefunden. Sie sind nicht nur unter milden Bedingungen bei der ROMP, der CM und der RCM erfolgreich eingesetzt worden, sondern besitzen auch eine bemerkenswerte Toleranz gegenüber unterschiedlichen organischen funktionellen Gruppen. Zum Beispiel zeigen Carbonsäure- oder Aldehyd-Gruppen keine Wechselwirkung mit den Katalysatoren. Die katalytische Aktivität wird nicht durch Luft, Feuchtigkeit oder Verunreinigungen in den Lösungsmitteln vermindert. Diese Ruthenium-Systeme **53** und **54** können selbst mehrere Wochen ohne nennenswerte Zersetzung an der Luft gelagert werden. Sie erreichen aber bei der Katalyse im Vergleich zu dem Molybdän-System, besonders bei sterisch anspruchsvollen Substraten, eine relativ langsamere Umsatzgeschwindigkeit. Der Rutheniumbenzylidencarbenkomplex **53** ist durch seine einfache Handhabung, sein breites Substratspektrum und seine Verfügbarkeit einer der besten Katalysatoren.

Als weiteres definiertes System wurde ein Wolfram-Carben-Komplex **55** entwickelt, der von Basset et al. durch eine C-H-Aktivierung mit einem Arylsubstituent hergestellt wurde.<sup>122</sup> Die Wirksamkeit dieses voluminösen Katalysators bleibt auch bei höheren Temperaturen und bei Heteroatome enthaltenden Edukten erhalten, ist jedoch abhängig vom sterischen Raumbedarf der Substrate.

Diese etablierten Katalysatorsysteme wurden weiterentwickelt. Die erste asymmetrische RCM wurde durch einen chiralen Katalysator aus Molybdän<sup>123</sup> ermöglicht und die erste RCM in Wasser und in Methanol durch einen Katalysator aus Ruthenium als Salz.<sup>124</sup> Neuere Studien zeigen, dass die katalytische Aktivität sehr abhängig von den Liganden ist.<sup>125</sup> Herrmann et al. haben daraufhin aktivere Katalysatoren **56** aus Ruthenium mit Imidazoliniden-Liganden hergestellt.<sup>126-129</sup>

### 5.1.2. Der Mechanismus der Metathesereaktion

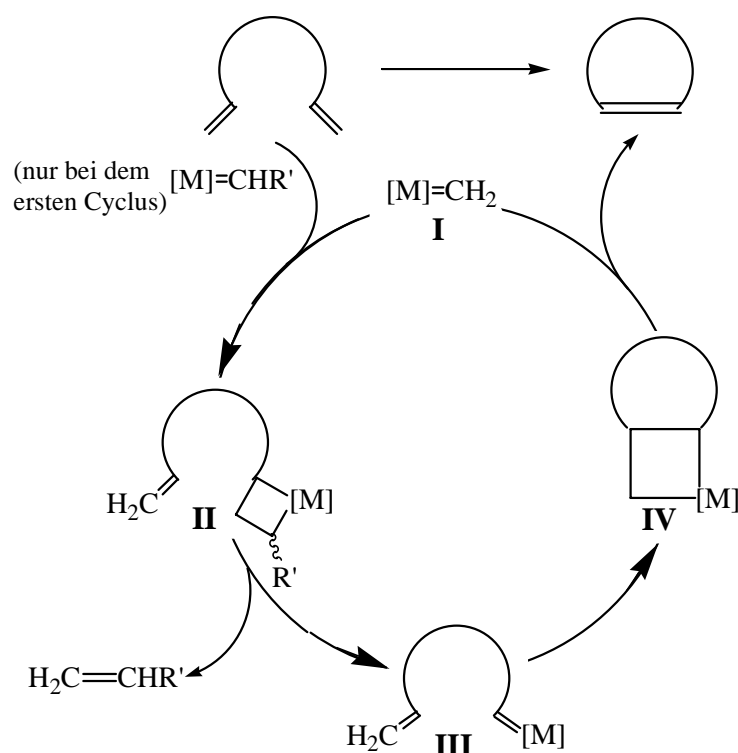
Bei den undefinierten katalytischen Systemen (ein *in situ* erzeugtes Gemisch aus zwei oder mehrere organometallischen Verbindungen) ist die katalytisch aktive Spezies nicht eindeutig bestimmt. Deshalb ist es schwierig, einen Mechanismus aufzustellen und zu überprüfen. In den definierten katalytischen Systemen wird angenommen, dass die katalytische kettenfortpflanzende Spezies ein Metallalkyliden **Ia** oder **Ib** ist.

Der assoziative Mechanismus (Abb. 5.9):

Die Anwesenheit von Metallacyclobutanen **IIa** und **IVa** wurde bewiesen.<sup>130</sup> Die Reaktion verläuft abwechselnd durch [2+2]-Cycloadditionen und Cycloreversion zwischen Metallalkyliden und Metallacyclobutan. Eine [2+2]-Cycloaddition findet zwischen dem Metallalkyliden **Ia** und dem Olefin statt, um ein Metallacyclobutan **IIa** als Zwischenstufe zu erzeugen. Die Retrocycloaddition führt dann zu dem Olefinmetatheseprodukt und zu einem neuen Metallalkyliden **Ia**, das den katalytischen Zyklus schließt.

Hierbei sind die Reaktionsschritte reversibel, und die Reaktion verläuft unter thermodynamischer Kontrolle. Im Fall der Ringschlussmetathese ist die Reaktion entropisch begünstigt, da aus einem Substrat zwei Produktmoleküle entstehen, von denen eines leicht flüchtig Produkt (z.B. Ethylen, Propen) ist.

Die Struktur des Alkens, das als Nebenprodukt entsteht, ist bei dem ersten Katalysezyklus abhängig von den Liganden des Katalysators. Bei den folgenden Cyclen ist die Bildung des Alkens Substrat-abhängig. Die Alkensubstitution im Substrat und Produkt kann dramatisch die Reaktionsgeschwindigkeit und den Reaktionsverlauf beeinflussen.



**Abb. 5.9.** Mechanismen der Ringschlussmetathese

Eine kinetische Studie mit Diethyldiallylmalonat und  $(Cy_3P)_2Cl_2Ru=CH_2$  hat neue Anhaltspunkte auf den Reaktionsmechanismus gegeben.<sup>125</sup> Der Vorteil dieses Katalysators liegt darin, dass alle Cyclen mit einem terminalen Alken identisch sind und Ethylen das einzige Nebenprodukt ist. Diese kinetischen Untersuchungen haben gezeigt, dass der üblicherweise vorgeschlagene Mechanismus (assoziative Mechanismus) in diesem Fall von geringer Bedeutung ist. Der wichtigste Reaktionsweg, der dissoziative Mechanismus, läuft durch einen Phosphinverlust vor der Bildung des Metallacyclobutans **II** ab. Es entsteht ein 14-Elektronen-Metallacyclobutan **IV** als Zwischenstufe. Die aktive Spezies **I** wird danach durch Addition eines Phosphinliganden regeneriert. Da der Reaktionsverlauf stark von der Struktur der Liganden abhängig ist, kann dieser Mechanismus nur mit Vorsicht auf andere Ru-Katalysatoren übertragen werden. Der „einfache“ Mechanismus (assoziative) bleibt jedoch weiterhin geeignet, um die meisten Ergebnisse zu verstehen und zu interpretieren.

Seit der Herstellung der Katalysatoren aus Molybdän und Ruthenium wurde die Ringschlussmetathese immer häufiger in der präparativen organischen Chemie angewandt. So wurden zum Beispiel Synthesen von Fünfringen bis Macrocyclen, Synthesen von *O*-, *N*-, und *S*-Heterocyclen und verschiedene synthetische Strategien, wie die Tandem-

Ringschlussmetathese oder die Ringschlussmetathese an der Festphase untersucht.<sup>131-137</sup>

In dieser Arbeit wird die Ringschlussmetathese auf Substrate mit ungeschützten Hydroxylgruppen angewandt. In der Literatur wurden bis jetzt nur Untersuchungen mit geschützten Substraten durchgeführt, um die Löslichkeit in unpolaren organischen Lösungsmitteln zu gewährleisten und Wechselwirkung mit den Katalysatoren zu verhindern. Relativ wenige Substrate mit einer ungeschützten Hydroxylgruppe wurden bei der Synthese von Carbocyclen unter üblichen Reaktionsbedingungen mit guten Ausbeuten umgesetzt.<sup>138-142</sup>

## 5.2. Ringschlussmetathese mit aromatischen Substraten

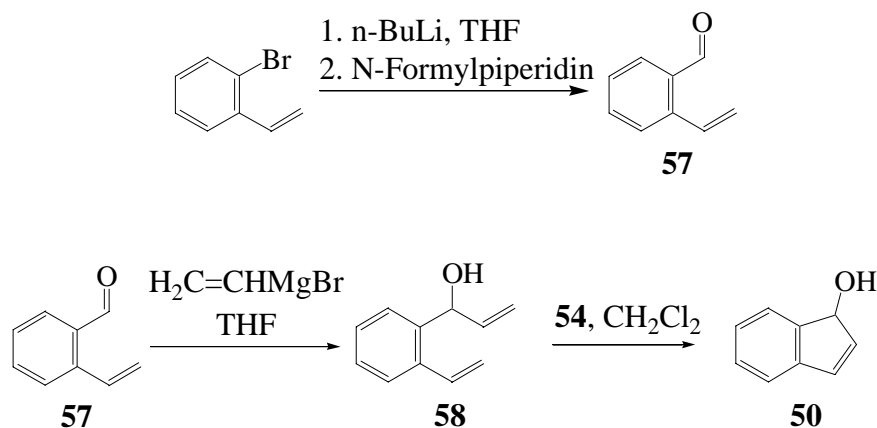
### 5.2.1. Synthese von 1-Indenol durch RCM

Bezüglich der vorgestellten retrosynthetischen Studie (Abb. 5.5) wurde der Aldehyd **57** quantitativ durch N-Formylierung von Bromstyrol nach Halogen-Metall-Austausch erhalten (Abb. 5.10).<sup>143</sup> Der relativ labile aromatische Aldehyd **57** wurde nach Aufarbeitung des Ansatzes ohne weitere Reinigung in den folgenden Schritt eingesetzt. Die Grignard-Addition von Vinylmagnesiumbromid verlief in 60% Ausbeute zum 1-(2-Vinylphenyl)prop-2-en-1-ol **58**, welches chromatographisch an Kieselgel aufgereinigt wurde.

Bei Raumtemperatur mit 4 Mol% **54** in Toluol wurde während einer Reaktionszeit von 18 h kein Umsatz festgestellt. Dagegen erfolgte die Ringschlussmetathese-Reaktion von **58** nach 4 Stunden sowohl bei 40°C in Toluol als auch in Dichlormethan unter Rückfluß quantitativ zu dem Indenol **50**. Die anschließende Aufarbeitung des Reaktionsgemisches nach der Umsetzung (Lösungsmittel entfernen und das Produkt chromatographieren) war jedoch nicht ausreichend. Das an Kieselgel chromatographierte Produkt blieb mit Spuren von Ruthenium aus der Zersetzung des Katalysators verunreinigt. Vor der Chromatographie wurde deshalb ein zusätzlicher Reinigungsschritt unter Verwendung von *Tris*(hydroxymethyl)phosphin eingeführt. Dieses Phosphin bildet mit Ruthenium einen Komplex, der leicht abgetrennt werden kann.<sup>144,145</sup> Eine weitere einfache Möglichkeit zur Aufreinigung haben Paquette et al. vorgestellt. Verunreinigungen aus Ruthenium und Phosphin werden durch Bleitetraacetat oxidiert und sind so gut abtrennbar.<sup>146</sup> Diese Methode ist aber für empfindliche Verbindungen nicht geeignet, da Bleitetraacetat ein sehr starkes Oxidationsmittel ist. Nach



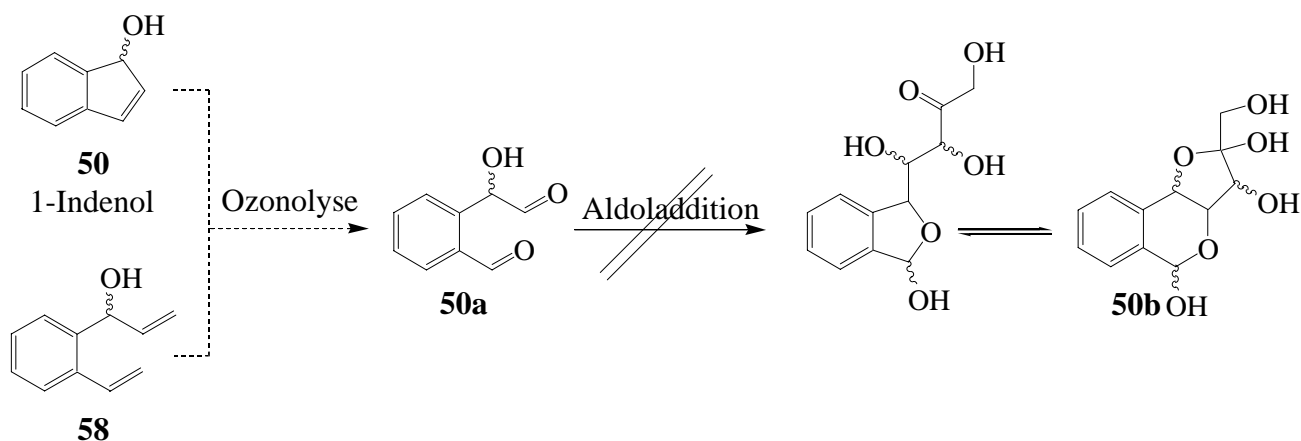
Aufarbeitung und Reinigung mit Hilfe von *Tris*-hydroxymethylphosphin zur Abtrennung von Metallverunreinigungen wurde 1-Indenol **50** (45 mg) mit 60% Ausbeute erhalten.



**Abb. 5.10.**        Synthese von 1-Indenol **50**

Die relativ milden Bedingungen der Ringschlussmetathese bei Anwendung des Katalysators **54** ermöglichen eine effiziente Synthese von dem Indenol **50**. Die Reaktion verlief in einem neutralen Milieu und die Bildung des Produkts ist thermodynamisch begünstigt.

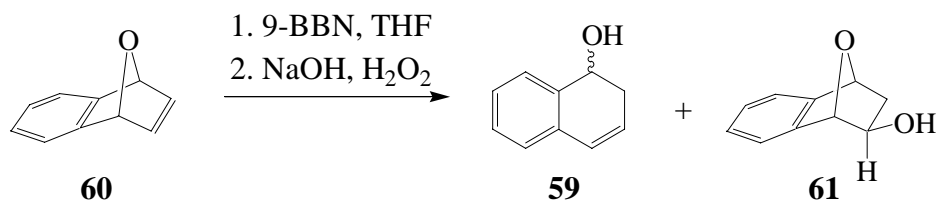
Indenol **50** oder das 1-(2-Vinylphenyl)prop-2-en-1-ol **58** stellen Vorstufen für den Dialdehyd **50a** als potentielles Substrat für DHAP-Aldolasen als Vorstufe dar. Aus diesen Edukten könnte das Produkt **50b** durch Ozonolyse und enzymatische Aldoladdition erhalten werden, bei dem der polyhydroxylierte Fünfring mit dem Sechsring des Lactols annelliert ist. Die Oxidation der Alkene mit Ozon lieferte ein komplexes und relativ instabiles Gemisch von Dialdehyden, die schlecht wasserlöslich sind (vermutlich wegen der Tendenz zur Bildung von Lactolen und Oligomeren Acetalen). Aus der enzymatischen Aldoladdition wurde zwar ein Umsatz durch DC festgestellt, es konnte jedoch kein einheitliches Produkt isoliert werden. Dies mag auf die relative Instabilität der entstandenen Dialdehyde und die Tatsache, dass eventuell nur ein Enantiomer aus dem racemischen Gemisch bevorzugt umgesetzt wird, zurückzuführen sein.



**Abb. 5.11.** Versuche einer Aldoladdition aus Indenol **50**

### 5.2.2. Synthese von 1,2-Dihydronaphthol

Anstatt dem 3-Hydroxyolefin **58** könnte auch das homologe 4-Hydroxyolefin eingesetzt werden, um das homologe 1-Hydroxy-1,2-dihydronaphthalin **59** herzustellen. In Rahmen einer Studie zu 3-Benzoxepin haben Jeffrey et al. die Synthese von 1-Hydroxy-1,2-dihydronaphthalin **59** aus 1,4-Epoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalin mit Methyllithium untersucht.<sup>147</sup> Nach 10-tägiger Reaktionsdauer bei Raumtemperatur wurde nur eine Ausbeute von 10% erreicht. Ein effizienterer Weg ist die Hydroborierung von 1,4-Epoxy-1,4-dihydronaphthalin **60** mit anschließender Oxidation (Abb. 5.12).<sup>148</sup> Die Hydroborierung wurde mit 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan (9-BBN) in THF bei 25°C durchgeführt, und die folgende Oxidation ergab quantitativ den Homoallylalkohol. Das 7-Oxa-*exo*-2-benzonorborneol **61** wurde nur noch in Spuren nachgewiesen.

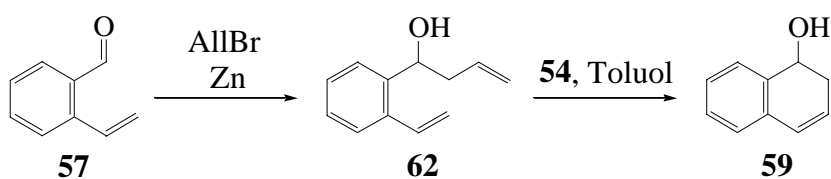


**Abb. 5.12.** Synthese von **60** durch Hydroborierung

Eine andere Herstellung wurde auch durch mikrobielle Hydroxylierung mit dem Bakterium *Pseudomonas putida* UV4 ermöglicht.<sup>149</sup> Das enantiomereine (*R*)-1-Hydroxy-1,2-

dihydronaphthalin (*R*)-**59**, Hauptprodukt der Monooxygenierung, wurde aus 1,2-Dihydronaphthalin mit 18% Ausbeute gewonnen. Dieser Metabolit kann auch aus dem kommerziell verfügbaren (*R*)-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin-1-ol mit 30% Ausbeute durch Acetylierung, Bromierung und anschließende Eliminierung erhalten werden.

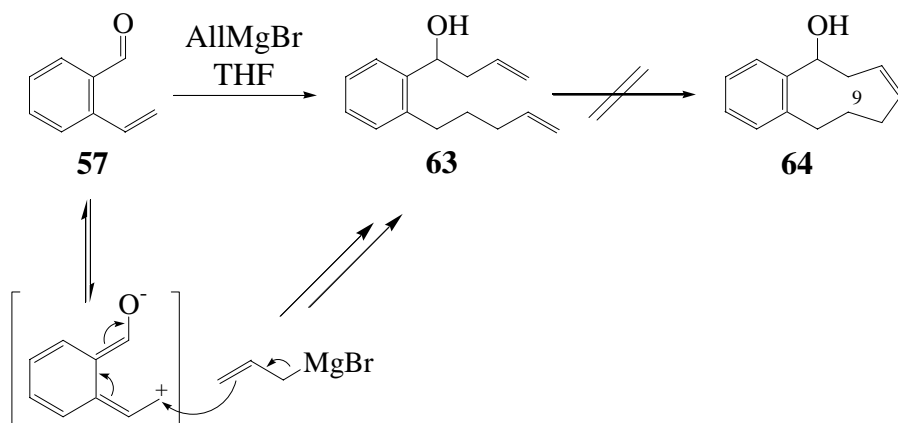
Eine wesentliche Verbesserung der literaturbekannten Ergebnisse konnte durch das folgende Syntheschema erzielt werden: Der Synthesebaustein **57** wurde in einem Zweiphasen-Gemisch nach der Barbier-Methode mit 1 Äq. Allylbromid/Zn allyliert (Abb. 5.13). Das Addukt **62** konnte nach Säulenchromatographie in 40% Ausbeute isoliert werden. Als Nebenprodukt entstand 2-Vinylbenzylalkohol aus der Reduktion von **57**.



**Abb. 5.13.** Synthese von **59** durch RCM

Die Ringschlussmetathese erfolgte mit 4 Mol% **54** in Toluol unter Rückfluß (4 h) praktisch quantitativ. Das 1,2-Dihydronaphthol **59** wurde nach Chromatographie an Kieselgel in 60% Ausbeute erhalten.

Wurden bei der Allylierung von **57** 2 Äq. Allylbromid oder Magnesiumallylbromid eingesetzt, so wurde das zweifach allylierte **63** in 25% Ausbeute erhalten (Abb. 5.14). Der Vinylbenzaldehyd **57** kann bei dieser Reaktion als benzoides Michael-System betrachtet werden.



**Abb. 5.14.** Doppelte Allylierung von **57**

Die Ringschlussmetathese zu mittelgroßen Ringen, insbesondere zu Cyclononenderivaten (Substrate ohne frei Hydroxylgruppen) hat sich als synthetisch anspruchsvolle Reaktion erwiesen, wie einige Beispiele in der Literatur gezeigt haben.<sup>131,150</sup> Die verschiedenen Metatheseversuche mit **63** (bis 10 Mol% **54**, in verdünnter Lösung) für einen Ringschluß blieben allerdings bisher erfolglos. Vermutlich hatte die Verbindung **63** durch den aromatischen Ring eine zu starre Konformation, die eine Wechselwirkung mit dem Katalysator **54** verhinderte.

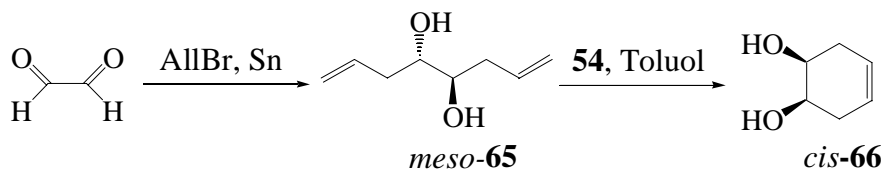
### 5.3. Ringschlussmetathese-Reaktionen mit aliphatischen Substraten

#### 5.3.1. Synthese von *cis*-4-Cyclohexen-1,2-diol

Die Synthese von ungesättigten Cyclen durch Ringschlussmetathese wurde erfolgreich mit aromatischen Verbindungen durchgeführt. Weitere Versuche zu interessanten hydroxylierten Produkten werden im folgenden mit aliphatischen Substraten vorgestellt.

In einem ersten Schritt wurde modellhaft die Ringschlussmetathese von *meso*-Octa-1,7-dien-4,5-diol *meso*-**65** zum *cis*-4-Cyclohexen-1,2-diol *cis*-**66** untersucht. *cis*-**66** wurde als eine Zwischenstufe zu verschiedenen oxygenierten Verbindungen wie Polyolen<sup>151-153</sup> oder Oxepanen<sup>154</sup> benutzt. In der Literatur werden zwei Synthesewege aus Cyclohexan-1,4-dien erwähnt. Auf dem ersten Weg wurde durch Acetylierung und Deacetylierung *cis*-**66** in 44% Ausbeute erhalten.<sup>155</sup> Eine andere Möglichkeit ist die *cis*-Dihydroxylierung mit katalytischen Mengen an Osmiumtetroxid und *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) als Cooxidant in einem Gemisch von Aceton und Wasser, wobei die Ausbeuten zwischen 32-65% betragen.

Um *cis*-**66** über eine Metathese-Reaktion aus *meso*-**65** zugänglich zu machen, wurde die Vorstufe *meso*-**65** aus Glyoxal hergestellt. Die Allylierung von Glyoxal-Dihydrat mit Zinn lieferte in 54% Ausbeute das *meso*- und das *rac*-1,7-Octadien-4,5-diol (*meso*-**65**, *rac*-**65**).<sup>13</sup> Mittels Chromatographie an Kieselgel wurden *meso*-**65** als farblose Plättchen (2.1 g, 20%) von *rac*-**65** als gelbliches Öl (2.6 g, 25%) getrennt erhalten (Abb. 5.15).

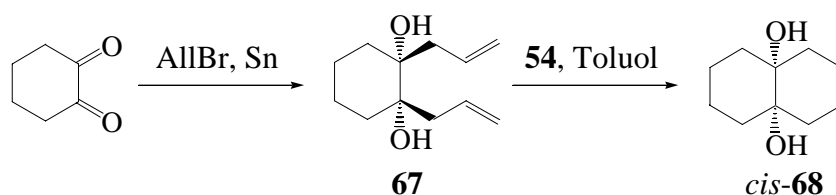


**Abb. 5.15.**      Synthese von *cis*-4-Cyclohexen-1,2-diol *cis-66* durch RCM

Die Ringschlussmetathese-Reaktion von *meso-65* erfolgte in trockenem Benzol unter Rückfluß (4 h) mit 1 Mol% **54** in 70% Ausbeute, wobei das Edukt (20%) noch partiell zurückgewonnen wurde. In trockenem Toluol unter Rückfluß (4 h) mit 5 Mol% **54** verlief die Reaktion ebenfalls mit 70% Ausbeute, wobei das Edukt auch ungefähr mit 20% zurückgewonnen wurde (Umsatz~80%). Diese Modellstudie wurde nur mit dem Stereoisomer *meso-65* durchgeführt.

### 5.3.2.      Synthese von *cis*-Bicyclo[4.4.0]dec-3-en-1,6-diol

Nach dem Muster der erfolgreichen Synthese von *cis-66* wurde versucht, das *cis*-Bicyclo[4.4.0]dec-3-en-1,6-diol *cis-68* nach der gleichen Reaktionssequenz herzustellen. Eine Synthese von **68** war durch saure Hydrolyse des Epoxides von dem 11-Oxatricyclo[4.4.1.0]undec-3-en beschrieben worden.<sup>156</sup> Das Dien **67** wurde selektiv durch die Sn-vermittelte *cis*-selektive Allylierung von Cyclohexan-1,2-dion in 36% Ausbeute erhalten (Abb. 5.16).<sup>157</sup> Die Ringschlussmetathese zu dem *cis*-Bicyclo[4.4.0]dec-3-ene-1,6-diol *cis-68* erfolgte in Toluol unter Rückfluß (4 h) mit 4 Mol% **54** in 60% Ausbeute.



**Abb. 5.16.**      Synthese von *cis-68* durch Ringschlussmetathese

Ringschlussmetathese-Reaktionen mit Addukten aus der Allylierung von Ketonen (Substraten, die den 4-Hydroxybuten-Muster besitzen) können an weitere Strukturen angewandt werden.<sup>158</sup> Durch Oxidation der Hydroxyl-Funktionen von *cis-68* können größere

Ringe mit Diketone-Funktion erhalten werden. Die Ringschlussmetathese erweist sich als eine Reaktion mit viel Potential für die Organische Synthese.

#### **5.4. Zusammenfassung**

Die Ringschlussmetathese-Reaktionen von ungeschützten Hydroxylgruppe enthaltenden Substraten mit unterschiedlichen Strukturen (lineares, cyclisches oder aromatisches Gerüst) erfolgen unter relativ milden Bedingungen (Dichlormethan, Benzol oder Toluol unter Rückfluß). Die Katalysatormenge (4-5% Mol) und die Reaktionsdauer (4 h) sind vergleichbar mit den üblichen Literaturbedingungen, und die Ausbeuten belagen meist mindestens 60%. Die Ergebnisse zeigen, dass die Toleranz des Katalysators **54** gegenüber solchen polarprotischen Substraten gut ist. Vor allem weist die hier etablierte Syntheseroute zu der sensitiven Verbindung **50** große Vorteile im Vergleich zu den publizierten Verfahren auf.

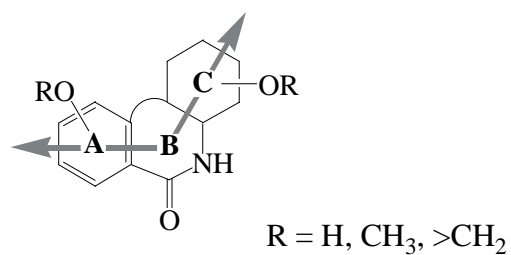
## 6. Analoga von Pancratistatin

### 6.1. Die *Amaryllidaceae*-Alkaloide

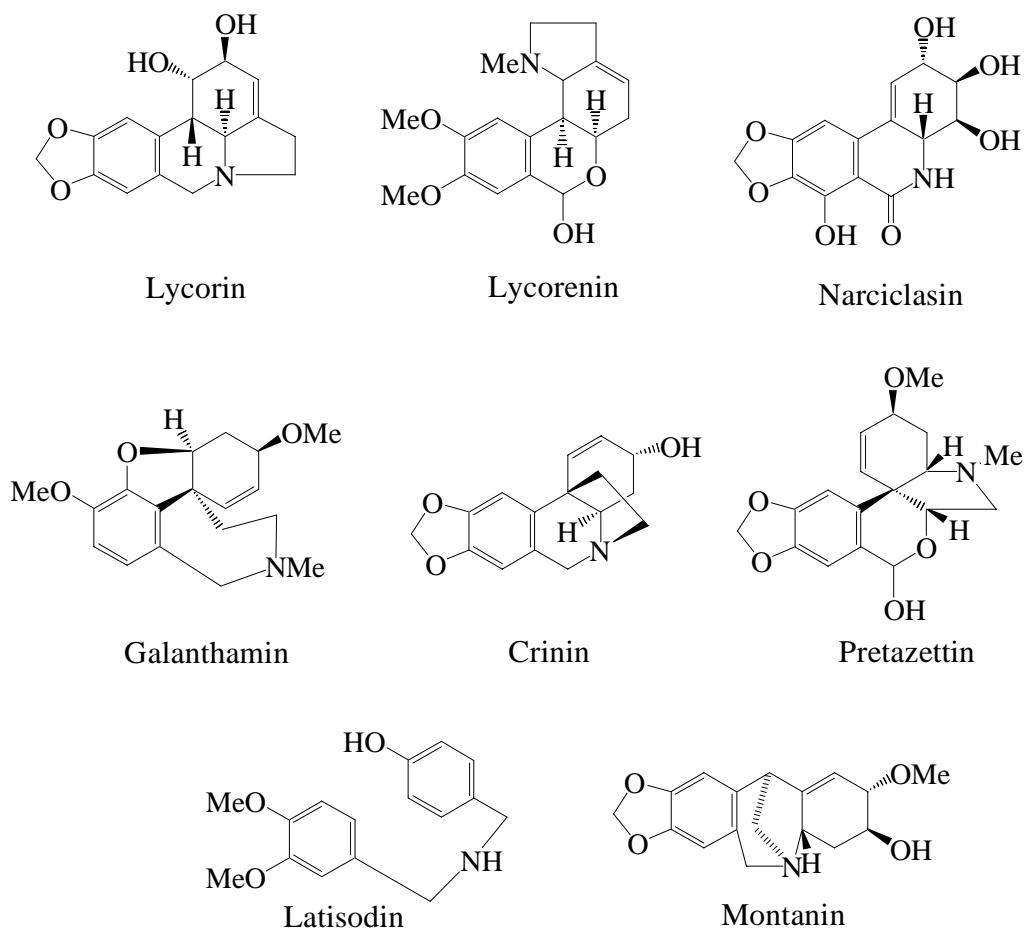
Schon vor der Entwicklung der modernen Naturstoff-Forschung wurden Pflanzen-Inhaltstoffe über Jahrtausende wegen ihrer medizinischen Wirksamkeit als Heilmittel eingesetzt. Eine pharmakologisch besonders wichtige Gruppe von Naturstoffen bilden hierbei die Alkaloide. Bis 1950 wurden basische Stickstoff-haltige Verbindungen aus Pflanzen als Alkaloide bezeichnet.<sup>159</sup> Heute gilt die Bezeichnung streng nur für Verbindungen, die N-Heterocyclen enthalten. Die Zahl der aus Pflanzen isolierten Alkaloide hat in den letzten Jahren rasch zugenommen. Alkaloide werden nicht nur nach der Pflanzenfamilie, aus der sie isoliert werden, sondern auch nach strukturellen Gemeinsamkeiten klassifiziert. Ihre Biosynthese erfolgt in der Regel aus Aminosäuren, aber in vielen Fällen sind die genauen Stoffwechsel-Wege nicht bekannt. Alkaloide erfüllen in Pflanzen vielseitige Funktionen, so als Schutzmittel gegen Fraß durch Tiere oder Insekten, als Stickstoffvorrat oder zum Abbau von toxischen Aminosäuren.

Eine pharmakologisch interessante Alkaloid-Familie bilden die *Amaryllidaceae*-Inhaltstoffe. Zu der Gattung der Amaryllisgewächse gehören z.B. Narzissen und Lilien.<sup>160</sup> Die medizinische Wirkung eines Öles aus der Narzisse *Narcissus poeticus* L. gegen Krebs war dem griechischen Arzt Hippocrates schon in der Antike (300 BC) bekannt. Aber erst 1877 wurde das Alkaloid Lycorin aus *Narcissus pseudonarcissus* isoliert, dessen Antitumorwirkung 1958 nachgewiesen werden konnte. Die *Amaryllidaceae*-Alkaloide sind Isocarbostryle, die potentielle antineoplastische und antivirale Wirkstoffe sind.<sup>161</sup> Ihre Funktionalitäten und Strukturen können sehr unterschiedlich sein, jedoch sind einige gemeinsame Merkmale zu erkennen :

- ein phenolisch substituierter aromatischer Ring (Teil A)
- ein Stickstoff-enthaltender Heterocyclus (strukturelle Vielfalt, Teil B)
- ein sauerstoffreicher aliphatischer Cyclus (Teil C), der in einigen Fällen ungesättigt ist, und die angulare Verknüpfung der Ringe A und C, wie es bei der folgenden Abbildung dargestellt wird.



Bis heute sind mehr als 100 Verbindungen isoliert worden, die nach Strukturkriterien in acht große Klassen unterteilt werden. Die Hauptvertreter dieser Klassen sind Lycorin, Lycorenin, Narciclasin, Galantamin, Crinin, Pretazettin, Latisodin und Montanin (Abb. 6.2).

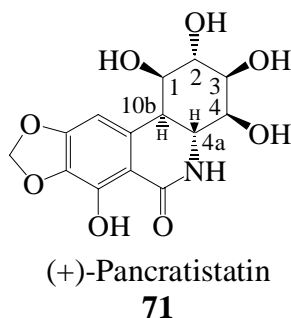


**Abb. 6.2.** Die *Amarillydaceae*-Alkaloide



## 6.2. Pancratistatin

### 6.2.1. Struktur des Pancratistatins

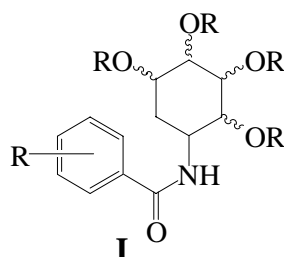


Pancratistatin **71** wurde erstmals 1984 aus der hawaiianischen Narzisse *Pancratium littorale* Jacq. isoliert und gehört zu der Klasse des Narciclasins, die das sauerstoffreiche Phenanthridon-Gerüst enthalten.<sup>162</sup> Es wurde komplett durch MS-EI, NMR, IR charakterisiert. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration basiert auf einer Röntgenstrukturanalyse eines kristallinen Monomethylether-Derivates.

### 6.2.2. Biologische Wirkung

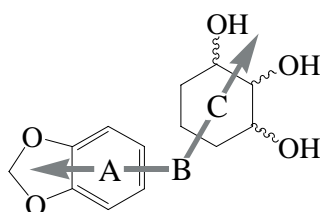
Von den bekannten *Amaryllidaceae*-Alkaloiden erwies sich **71** *in vitro* und *in vivo* als ein sehr versprechender antitumoraler und antiviraler Wirkstoff. In Zellkulturversuche wurden die Zelllinien “murine P388 lymphocytic leukemia” und “murine M5076 ovary sarcoma” erfolgreich untersucht.<sup>163</sup> **71** und 7-Desoxypancratistatin haben hohe prophylaktische Eigenschaften gegen RNA-enthaltende Flaviviren gezeigt.<sup>164</sup> Der Wirkungsmechanismus von **71** ist noch nicht endgültig aufgeklärt, es wird aber vermutet, dass es ähnlich wie das strukturell verwandte Narciclasin wirkt, das als Inhibitor der ribosomalen Peptidyltransferase in eukaryotischen Zellen die Proteinbiosynthese unterbricht.<sup>165-169</sup>

Chrétien *et al.* haben *seco*-Derivate **I** untersucht, Amid-Analoga von Narciclasin und Derivate mit verschiedenen substituierten Aromaten, bei denen die 10a-10b Bindung fehlt (Derivate, bei denen der B-Ring nicht geschlossen ist).<sup>170</sup>



Solche Derivate **I** können aus D-Glucose durch eine stereospezifische Ferrier-Carbocyclisierung hergestellt werden. Sie zeigen jedoch keine biologische Aktivität. Vermutlich durch ihre gestreckte Konformation wird die Wechselwirkung mit dem Ribosom verhindert. Die tricyclische Struktur scheint somit essentiell für die Inhibition der ribosomalen Peptidyltransferase zu sein.

Weiterführende Struktur-Aktivität-Studien erlaubten es, essentielle funktionelle und geometrische Merkmale für die biologische Wirkung zu bestimmen: die Piperonyleinheit (Ring A), die Polyol-ähnliche Einheit (Ring C) und ihren Verknüpfungstyp zueinander (Geometrie).



Bedauerlicherweise ist die Verfügbarkeit der Naturstoffe aus pflanzlichen Reserven begrenzt. Eine Extraktion aus 45 kg Zwiebeln lieferte nur 6.5 g an Pancratistatin **71**. Um dieses Problem zu beseitigen, wurden Versuche mit gentechnisch modifizierten Pflanzen unternommen, wobei die Ergebnisse nicht sehr vielversprechend fielen: 17.9 g anstatt 15 g aus 100 kg Zwiebeln *Hymenocallis littoralis* aus Hawaii.<sup>171</sup>

Für die Organische Chemie stellt die Synthese von Pancratistatin **71** eine hoch attraktive Herausforderung dar. Eine effiziente Synthese würde zudem die Möglichkeit bieten, Derivate oder Analoga mit eventuell verbesserten Eigenschaften zu erhalten.

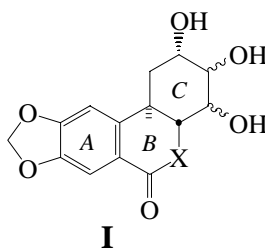
### 6.2.3. Synthese von Pancratistatin

Die Chemie der *Amaryllidaceae*-Alkaloide wurde ausführlich untersucht und in Übersichtsartikeln vorgestellt.<sup>160</sup> 1997 wurden erste Totalsynthesen von Lycoricidin und Narciclasin veröffentlicht.<sup>172</sup>

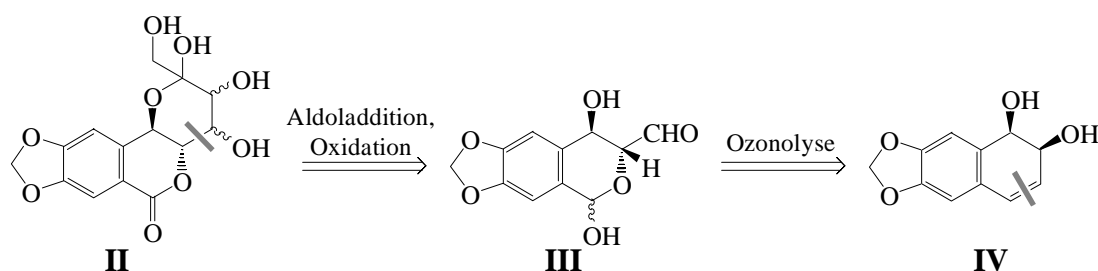
Die Hauptschwierigkeiten der Synthese von **71** sind die spezifische Bildung des Lactams (Ring B) und die Stereochemie des sauerstoffhaltigen Ringes C. Danishefsky berichtete 1989 über die erste Synthese des racemischen Pancratistatins.<sup>173</sup> 1995 wurden die ersten asymmetrischen Synthese von Trost und von Hudlicky vorgestellt.<sup>174-176</sup> Die allgemeine Synthesestrategie besteht im Aufbau der A- und C-Ringe mit den erforderlichen Funktionalitäten und Konfigurationen, in ihrer Kupplung und in der Cyclisierung zum B-Ring. Die Hauptschwierigkeit bei dieser Strategie ist die Kontrolle der Stereochemie der Kohlenstoffe C-10b und C-4a sowie die des hydroxylierten C-Ringes.

### 6.3. Synthese von Pancratistatin-Analoga

Aus der oben erwähnt notwendigen Merkmale für die biologische Wirkung konnte ein minimale Pharmacophor-Struktur I abgeleitet werden. Die Cyclitoleinheit könnte durch einen Kohlenhydratbaustein nachgeahmt werden, wobei die meisten Hexoaldosen und –ketosen im wässrigen Milieu eine cyclische Pyranosestruktur bevorzugen.



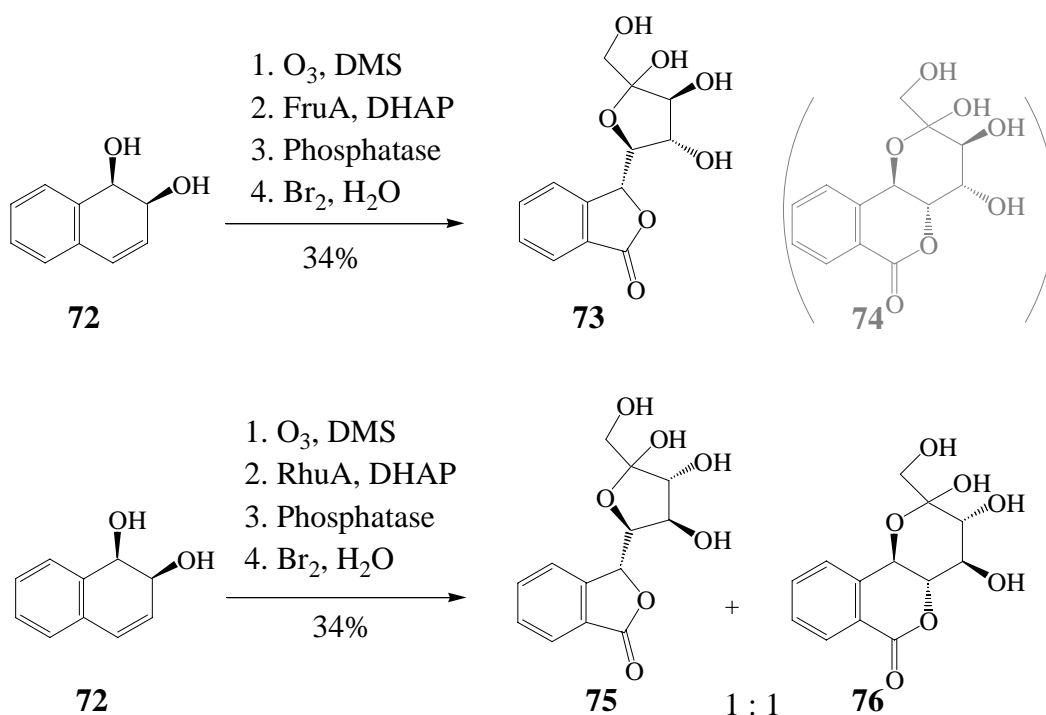
Die folgende Strategie besteht dann in einem chemo-enzymatischen Weg zu strukturell ähnlichen Verbindungen von **71**. Der Syntheseweg beruht darauf, vom Piperonylrest (A-Ring) auszugehen und den Polyolrest (C-Ring) durch einem Zucker-Rest nachzuahmen. Der B-Ring würde durch Lactonbildung bei der Oxidation eines Lactols erzeugt. Das gewünschte Substrat muß dann den Piperonylrest, ein Olefin und geeignete Hydroxylgruppen enthalten, um den Aldehyd und das Lactol zu bilden. Das Amid (Ring B) wird durch ein Lacton ersetzt und der Ring C durch ein Pyranose.



**Abb. 6.3.** Ausgewählte Strategie

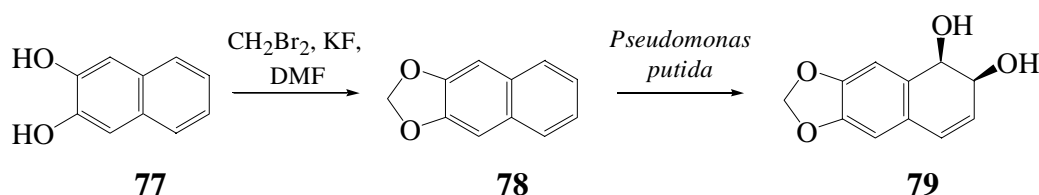
Naphthalinderivate können durch Toluoldioxygenase (TDO oder NDO) zu chiralen Diolen **IV** stereospezifisch funktionalisiert werden. Nach einer Ringöffnung durch Olefinspaltung würden die Verbindungen **III** erhalten. Eine enzymatische Aldoladdition mit DHAP aus **III** sollte zu den Zielstrukturen **II** führen, wobei die cyclische Zuckereinheit den Ring C ersetzt.

In unserem Arbeitskreis hatte Frau Dr. Zannetti 1996 eine Modellstudie zur Synthese von Pancratistatin-Analoga ausgehend von kommerziellem 1,2-Dihydronaphthalin-*cis*-1,2-diol **72** durchgeführt. Dieses wurde aus der von Genencor\* ausgearbeiteten microbiellen Oxidation von Naphthalin mit Toluoldioxygenase erhalten (Abb. 6.4).<sup>177</sup> Diese Dioxygenasen aus verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen, die gentechnisch in *Escherichia coli* überexprimiert wurden, bieten einen leistungsvollen Zugang zu aromatischen *cis*-Diolen.<sup>178</sup> Die Ringöffnung durch Ozonolyse und die Aldoladdition mit den DHAP-Aldolasen, FruA (aus Kaninchenmuskel) und RhuA führten tatsächlich zu Lactolen, die mit Brom zu den entsprechenden stabilen Lactonstrukturen, **73**, **75** und **76** oxidiert werden konnten.



**Abb. 6.4.** Modellstudien mit 1,2-Dihydronaphthalin-*cis*-1,2-diol **72**

Im Hinblick auf die Pancratistatinstruktur sollte anstelle des 1,2-Dihydronaphthalin-*cis*-1,2-diols **72** unsere Studie nun mit dem *cis*-Diol **79** ergänzt werden (Abb. 6.5). **79** wurde nach Acetalbildung aus dem Naphthalin-Baustein **77** erhalten, der stereoselektiv mit der Naphthalindioxygenase funktionalisiert werden mußte.



**Abb. 6.5.** Synthese von **79**

Zunächst wurde **78** aus Naphthalin-2,3-diol **77** durch Alkylierung in 80% Ausbeute erhalten.<sup>179,180</sup> Die *cis*-Dihydroxylierung wurde bei Genencor\* durchgeführt. Nachdem eine Screeningstudie die Toluoldioxygenase ausgeschlossen hatte, wurde das *cis*-Diol **79** mit einer Naphthalindioxygenase aus *Pseudomonas putida* G7 mit einer Ausbeute von 85% in enantiomerenreiner Form (> 98% *ee*) erhalten. Die Ausbeuteverluste sind auf die geringe chemische Stabilität von **79** zurückzuführen. Das Rohprodukt **79** aus der mikrobiellen

Dihydroxylierung wurde als Gemisch mit dem Edukt **78** erhalten, wobei durch Säurekatalyse eine rasche Eliminierung zu Naphtholen auftreten kann. Eine Flash-Chromatographie an Kieselgel lieferte das reine *cis*-Diol **79**, das unverzüglich mit Ozon oxidiert wurde. Der aromatische Rest von **79** ist durch die elektronenschiebende Substitution mit dem Dioxol gegenüber Oxidation sehr empfindlich und kann bei langer Reaktionszeit zerstört werden. Die Ozonolyse wurde daher vorsichtig durchgeführt und das Edukt **79** nur unvollständig (bis 95% laut DC) umgesetzt, so dass die Zersetzung der gebildeten Produkte verhindert werden konnte (für einen Millimol Ansatz, niedriger O<sub>2</sub>-Durchfluß und kurze Reaktionszeit, Kontrolle des Umsatzes durch DC). Aus der Ozonolyse wurde ein Gemisch von Dialdehyden mit verschiedenen Strukturen im Gleichgewicht erhalten, unter anderen die Strukturisomeren **80a** und **80b** sowie deren Hydrate (Abb. 6.6). Die NMR-Analyse konnte nur die Anwesenheit von mehreren Isomeren bestätigen, ohne die Bestimmung einer Hauptkomponente zu ermöglichen. Dieses Gemisch wurde für die enzymatische Aldoladdition weiter eingesetzt und diese wie üblich durchgeführt. DHAP und Aldolasen wurden in Abstand von 24 Stunden zweimal zugegeben. Nach 4 Tagen erfolgte die Aufarbeitung des Ansatzes für die Dephosphorylierung mit der alkalischen Phosphatase. Die Enzyme wurden durch Ausfällung mit Aktivkohle und Filtration entfernt. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde ein komplexes Gemisch von Addukten erhalten, wobei **81** und **82** entsprechend den Ergebnissen aus der Umsetzung von **72** zwei plausible Hauptprodukte darstellen.

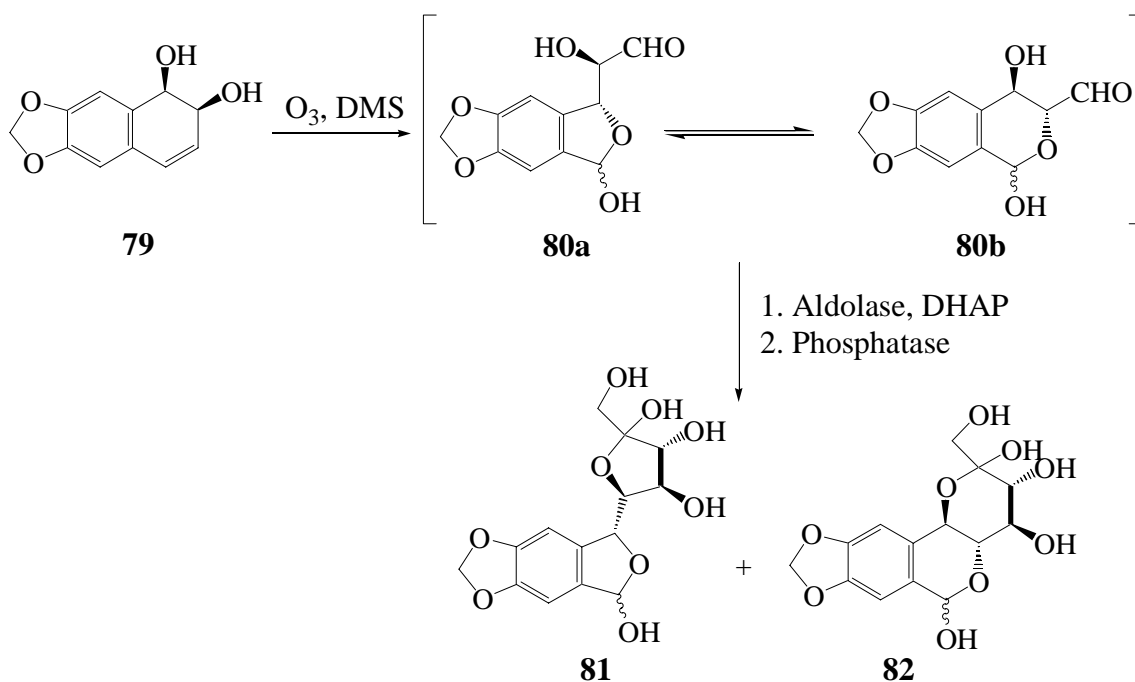
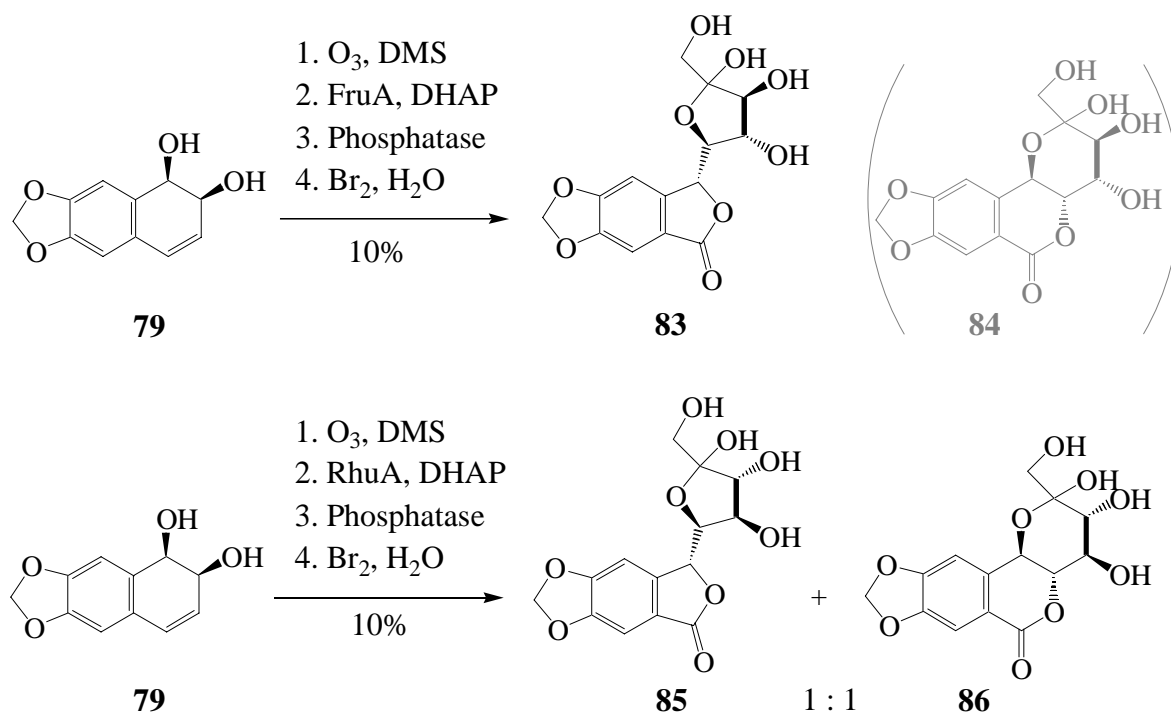
Abb. 6.6. Ozonolyse und enzymatische Aldoladdition mit **79**

Abb. 6.7. Synthese von Pancratistatin-Analoga

Das Gemisch der Lactole (**81** und **82**) wurde mit Brom in Wasser in Gegenwart von  $BaCO_3$  vorsichtig zu Lactonen oxidiert. Aus der erhaltenen Reaktionsmischung wurden die

erwarteten Lactone **83** und **84** isoliert (Abb. 6.7). Laut NMR wurden keine acyclische Produkte gebildet, die Furanose und Pyranose sind thermodynamisch offenbar stabiler als die lineare Isomere.

Die Stereochemie der *cis*-Hydroxylgruppen des Pancratistatins entspricht der *L*-erythro-Konfiguration, die durch eine TagA-katalysierte Aldolreaktion gebildet würde, die allerdings wegen ihrer sehr geringen Stereoselektivität mit nicht natürlichen Substraten in der organischen Synthese fast gar nicht verwendet wird.<sup>181-183</sup> Versuche mit FucA aus *E. coli* blieben vermutlich auf Grund ihrer relativ höheren Substratspezifität bisher ergebnislos.

Die Ergebnisse aus der Aldoladdition mit FruA und RhuA sind mit den Ergebnissen von Zannetti vergleichbar. Die isolierten Ausbeuten fielen aber deutlich niedriger aus, was vermutlich auf die höhere Empfindlichkeit der Zwischenstufen wie z.B. der Aldehyde **80a** und **80b** zurückzuführen ist.

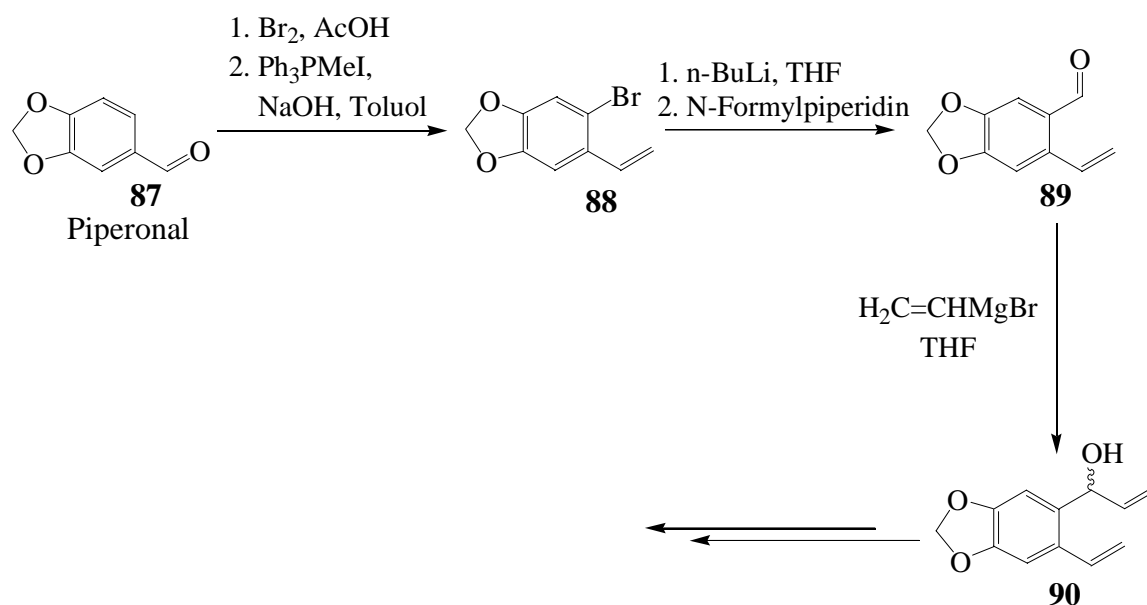
Aus der Aldoladdition mit FruA wurde nur ein Stereoisomer **83** (das Pendant zu **73**) isoliert, aus der Aldoladdition mit RhuA wurden zwei Stereoisomeren im Verhältnis von 1:1 (laut NMR-Spektroskopie) **85** und **86** (die Pendants zu **75** und **76**) erhalten, die chromatographisch getrennt werden konnten. **84** und sein Pendant **74** aus der Modellstudie konnten weder durch DC noch durch NMR-Analyse der Rohprodukte identifiziert werden. Die *D-threo*-Konfiguration des FruA-Addukts ist wegen der diaxialen 1,3-Wechselwirkung im Sechsring thermodynamisch ungünstiger. **86** besitzt mit den zwei annellierten Sechsringen die gesuchte Struktur, **83** und **85** stellen aber auch interessante neue Produkte dar, die eine ähnlich komplexe Geometrie und die gleiche Dichte an funktionellen Gruppen haben (Piperonylrest, Lacton und das Hydroxylierungsmuster mit 4 benachbarten Stereozentren).

#### 6.4. Zusammenfassung

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen das Potential der Aldolasen bei der enantioselektiven Synthese von polyfunktionalisierten Verbindungen mit komplexer Struktur und hoher Dichte an Chiralitätszentren. Im Hinblick auf die Synthesestrategie wäre auch ein Syntheseweg aus Piperonal vorstellbar, wobei der Dioxolanring die Löslichkeit des Dialdehydgemisches verbessern könnte (Abb. 6.8). Piperonal ist ein geeigneter Baustein für den Zugang zu *Amaryllidaceae*-Alkaloiden, wie eine Totalsynthese von Lycoricidine aus Brompiperonal durch Keck et al. dokumentiert.<sup>184</sup>



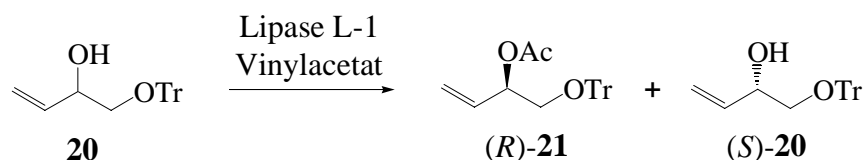
Die Bromierung von Piperonal **87** wird bei Raumtemperatur (20 h, 82% Ausbeute) mit Brom in Essigsäure durchgeführt.<sup>185</sup> Die Olefinierung von **87** nach Wittig ist bekannt (bis 96%)<sup>186-188</sup> Die folgenden Stufen zum Aldehyd **89** und die Vinylierung zu **90** wurden bereits in Kapitel 5 (RCM) beschrieben.



**Abb. 6.8.** Syntheseweg aus Piperonal **87**

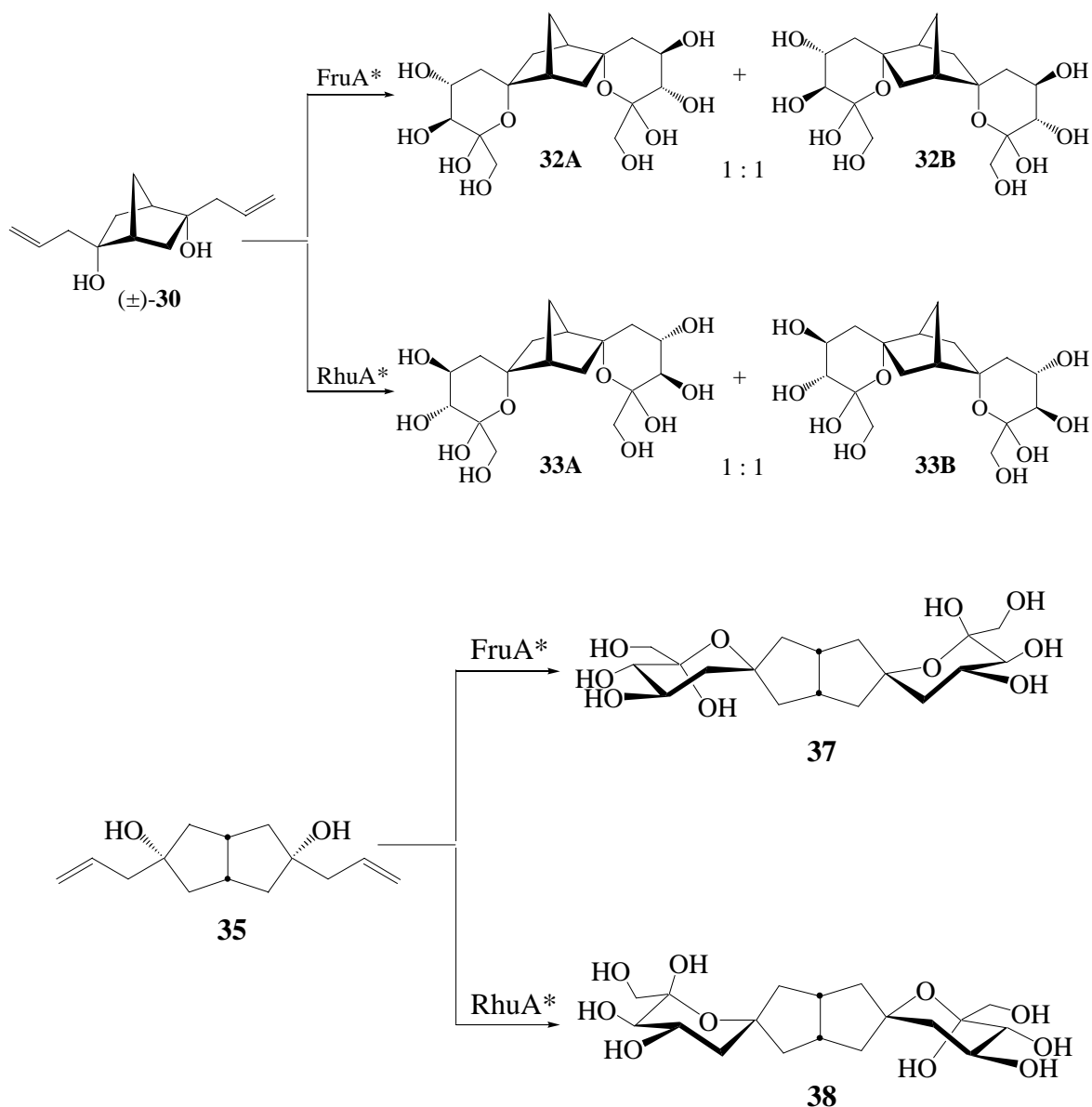
## 7. Zusammenfassung und Ausblick

♦ Die Racematspaltung durch Acetylierung mit Vinylester (Vinylacetate) bietet einen effizienten Weg zu enantiomerenreinen 1,2-Diolen. Die enzymatische Veresterung von 1-*O*-Tritylbuten-2-ol **20** mit der Lipase L-1 (Lipase PS) stellte sich als eine leistungsvolle Reaktion zur Gewinnung von dem enantiomerenreinen 3-Buten-1,2-Diol dar. Bei einem Umsatz von 46% wurde der Alkohol (*S*)-**20** mit einem *ee*-Wert von >98% erhalten und das Acetat (*R*)-**21** mit 95% *ee*. Der Wert des Enantiomerenverhältnisses (*E*>200) bestätigt den idealen Ablauf der enzymatischen Umsetzung. Diese 1,2-Diole stellen als Glycerinaldehydanaloga vielseitige Edukte für die Synthese von neuen Kohlenhydraten dar.



**Abb. 7.1.** Acetylierung mit der Lipase L-1 von **20**

♦ Tandem-Aldoladditionen bestehen in einer bidirektionalen, enantio- und diastereoselektiven Kettenverlängerung neue komplexe Saccharid-Mimetika. Die Umsetzung von symmetrischen Diketonen lieferte nach einer Barbier-Allylierung, einer Ozonolyse, einer enzymatischen Aldoladdition und einer anschließenden Dephosphorylierung neue *Spiro*-Saccharide. Trotz der begrenzten Substrattoleranz wurden Edukte mit verschiedenen Symmetriemustern ( $C_2$ ,  $C_{2v}$ ) erfolgreich eingesetzt. Die FruA- und RhuA-Bisaddukte wurden aus dem  $C_2$ -symmetrischen Norbornan-2,5-dion ( $\pm$ )-**29** (bzw. ( $\pm$ )-**30**) mit 18% **32** bzw. 12% **33** Gesamtausbeute erhalten. Daneben konnten aus dem  $C_{2v}$ -symmetrischen Bicyclo[3.3.0]octan-3,7-dion ( $\pm$ )-**34** (bzw. **35**) mit 10% **37** bzw. 8% **38** erhalten werden.

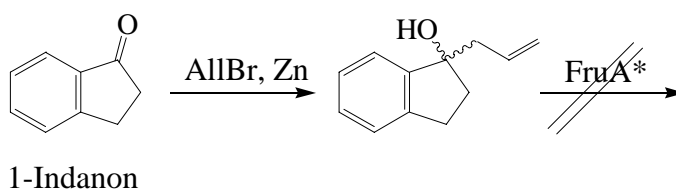


**Abb. 7.2.** Tandem-Aldoladdition aus **30** und **35**

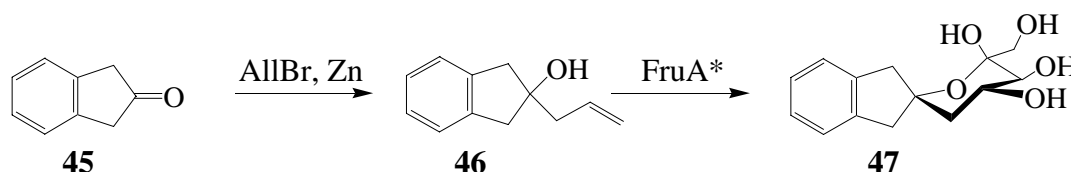
Die begrenzten Ausbeuten sind vermutlich auf die sterische Hinderung solcher komplexer Substrat-Strukturen (Norbornan- und Bicyclo[3.3.0]octan-Gerüst, *spiro*-Kohlenstoff) zurückzuführen. Diese Aldehyde sind jedoch noch so flexibel, dass das aktive Zentrum der Aldolase erreichen können.

Beim Einsatz von aromatischen Substraten in der enzymatischen Aldoladdition wurden noch größere Schwierigkeiten als bei aliphatischen und sperrigen Substraten beobachtet. Aromatische Substrate haben im Allgemeinen eine niedrigere Löslichkeit in wässriger Phase. Die durch DHAP-Aldolasen katalysierte Tandem-Aldoladdition von aromatischen

Verbindungen mit dem Indan-Gerüst erwies sich als schwierig, hauptsächlich wegen ihrem Raumbedarf und den hydrophoben Eigenschaften.



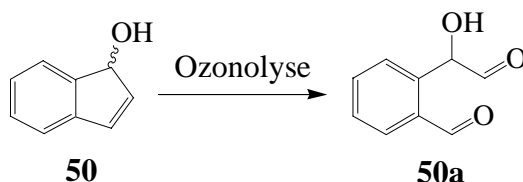
Nur das schlankere symmetrische 2-Indanon **45** konnte erfolgreich umgesetzt werden.



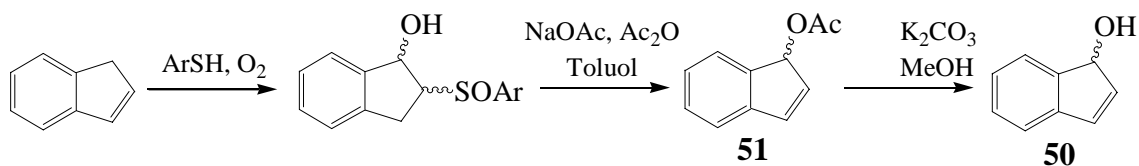
**Abb. 7.3.** Tandem-Aldoladdition aus 2-Indanon **45**

Unter üblichen Standardbedingungen konnte nur 1% **47** erhalten werden. Mit einer verbesserten Aufarbeitung der Reaktion aus **46** konnte die Ausbeute jedoch signifikant erhöht werden. Der Syntheseweg mit Isolierung des Aldehyds als Acetal lieferte **47** mit 11% Ausbeute, bei der Durchführung der Aldoladdition in Tris-Puffer wurde **47** sogar mit 14% Ausbeute erhalten. In Tris-HCl-Puffer (20-60 mMol., pH = 6.9) sollte sich ein löslichkeitsverbesserndes Gleichgewicht zwischen dem freien Aldehyd und dem entsprechenden Imin (Schiffsche-Base) einstellen.

1-Indenol **50** als Vorstufe zu dem Dialdehyd **50a** war ein potentiell interessantes Substrat für die Aldolasen. **50a** besteht aus dem aromatischen Rest und aus einem hydrophileren Teil, wobei die Löslichkeit im wässrigen Milieu für eine enzymatische Aldoladdition akzeptabel sein sollte.

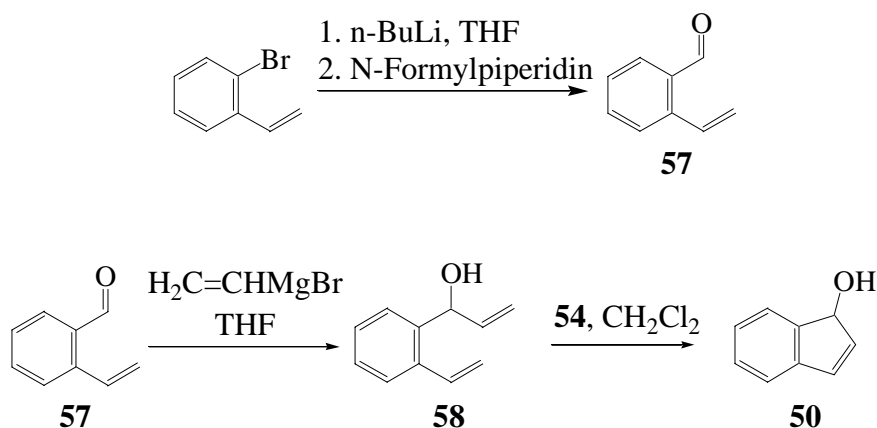


Die Synthese von 1-Indenol **50** wurde durch Cooxidation von Inden mit *p*-Chlorthiophenol untersucht. Nach der Eliminierung und der gleichzeitigen Acetylierung wurde **50** nach der Hydrolyse des Acetals mit 50% Ausbeute erhalten.



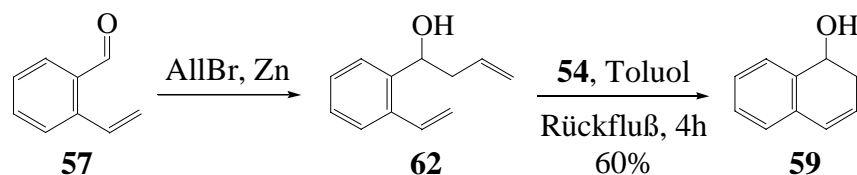
**Abb. 7.4.**      Synthese von 1-Indenol **50** durch Cooxidation

♦ Eine interessante Alternative zu der Cooxidationsroute bietet die Ringschlussmetathese (RCM). 1-(2-Vinylphenyl)prop-2-en-1-ol **58** wurde quantitativ zu Indenol **50** durch einer Ringschlussmetathese-Reaktion mit 4 Mol% des Grubbs-Katalysator **54** in Toluol bei 40°C oder in Dichlormethan unter Rückfluß bei einer Reaktionszeit von 4 Stunden umgesetzt. Nach Aufreinigung wurde **50** mit 60% Ausbeute erhalten.



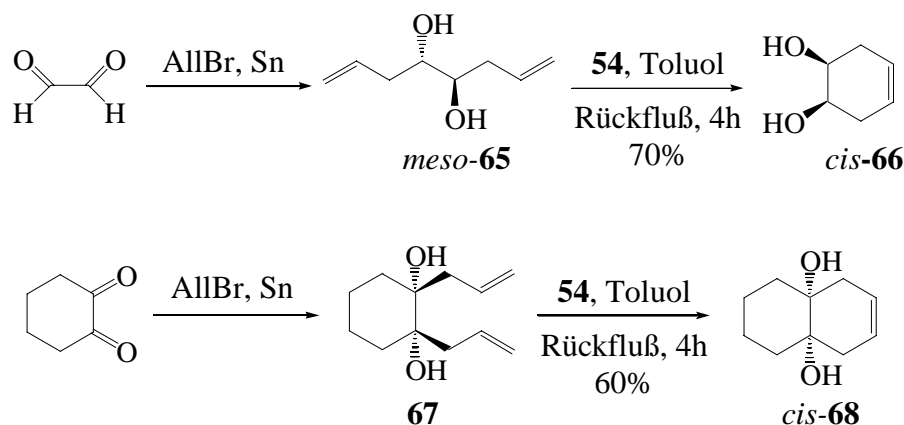
**Abb. 7.5.**      Synthese von 1-Indenol **50** durch RCM

Weitere strukturell unterschiedliche Edukte mit ungeschützten Hydroxylgruppen konnten mit einer akzeptablen Ausbeute umgesetzt werden. Eine homologe Verbindung zu **50**, das 1,2-Dihydronaphthol **59** wurde durch RCM aus dem 1-(2-Vinylphenyl)buten-3-en-1-ol **62** erhalten.



**Abb. 7.6.** Synthese von **59** durch RCM

Durch RCM mit 4–5 Mol% **54** wurde das *meso*-Octa-1,7-dien-4,5-diol *meso*-**65**, eine lineare aliphatische Verbindung, zu dem *cis*-4-Cyclohexen-1,2-diol *cis*-**66** umgesetzt. Ebenso konnte *cis*-1,2-Diallyl-*cis*-1,2-cyclohexandiol **67** als cyclisches Derivat zu dem *cis*-Bicyclo[4.4.0]-dec-3-en-1,6-diol *cis*-**68** umgesetzt werden.

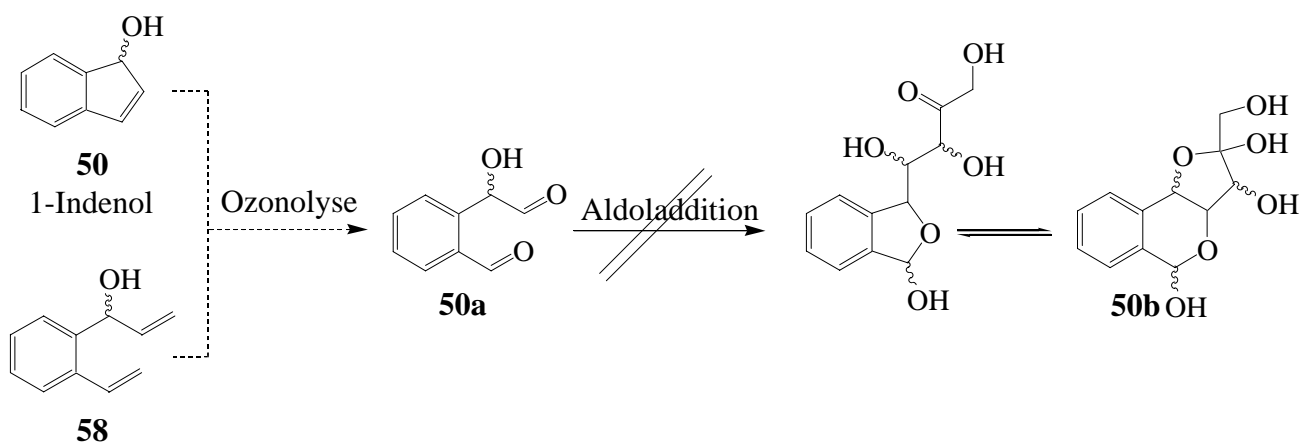


**Abb. 7.7.** Synthese von *cis*-4-Cyclohexen-1,2-diol *cis*-**66** und von *cis*-Bicyclo[4.4.0]-dec-3-en-1,6-diol *cis*-**68** durch RCM

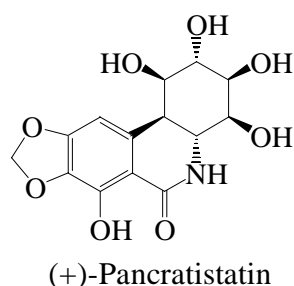
Die Ringschlußmetathese-Reaktionen von ungeschützten Hydroxylgruppen enthaltenden Substraten mit unterschiedlichen Strukturen (lineares, cyclisches oder aromatisches Gerüst) bieten einen einfachen Zugang zu komplexen Verbindungen (ungesättigten Bi- oder Monocyclen). Die relativ milden Bedingungen (Benzol, Toluol oder Dichlormethan unter Rückfluß), die Katalysatormenge (4-5% Mol) und die Reaktionsdauer (4 h) liegen in Rahmen vergleichbarer Literaturangaben und die Ausbeuten betragen in der Regel mindestens 60%. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Toleranz des Katalysators **54** gegenüber solchen Substraten recht gut ist.

Aus dem 1-Indenol **50** und aus dem 1-(2-Vinylphenyl)prop-2-en-1-ol **58** wurden eine Ozonolyse und eine anschließende enzymatische Aldoladdition durchgeführt, aus denen kein Produkt isoliert werden konnte. Aus der Ozonolyse wurde ein komplexes und relativ

instabiles Gemisch von Dialdehyden erhalten, die schlecht wasserlöslich und nur begrenzt stabil sind.

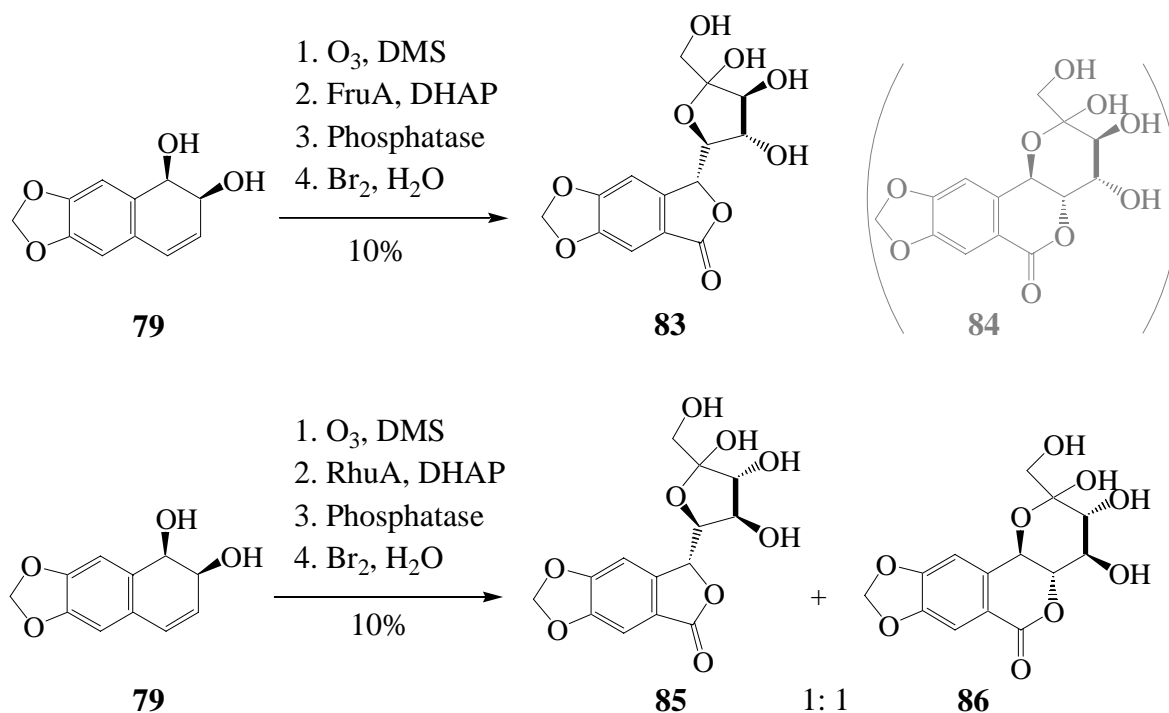


Aber strukturell verwandte Verbindungen aus Naphthalin-Bausteinen wurden für eine DHAP-Aldoladdition untersucht. Dabei konnten strukturelle Analoga des Alkaloids Pancratistatin erhalten werden.



♦ Aus dem *cis*-Diol **79** wurden die Zielstrukturen durch oxidative Ringspaltung mit Ozon, gefolgt von einer enzymatischen DHAP-Aldoladdition mit FruA bzw. RhuA hergestellt. Das *cis*-Diol **79** wurde durch eine *cis*-Dihydroxylierung mit der Naphthalindioxygenase aus dem 1,3-Dioxolnaphthalin **78** erhalten.

Die fünfstufige Reaktionsequenz lieferte mit einer Ausbeute von jeweils 10% das FruA-Addukt **83** bzw. die RhuA-Addukte **85** und **86**. Das FruA-Addukt **84**, ein Pendant zu **86**, wurde nicht nachgewiesen, vermutlich wegen ungünstiger sterischer Wechselwirkungen im Sechsring.



**Abb. 7.8.**      Synthese von Pancratistatin-Analoga

Diese Verbindungen enthalten ein Zucker-Gerüst, das den Cyclitolrest des Pancratistatins nachahmt. Diese Strategie mittels enzymatischen Aufbau stellt eine effiziente Synthese von noch komplexen Strukturanaloga des Alkaloids Pancratistatin dar.

Diese Ergebnisse zeigen, wie vielfältig und nützlich der Einsatz von Biokatalysatoren sein kann. Anspruchsvolle, nicht-natürliche Substrate konnte hergestellt werden. Die Ausbeute der meisten Umsetzungen könnten vermutlich noch erhöht werden, z.B. durch Verbesserung des Reaktionsablauf oder durch Anpassung der Katalysatoren. Die chemische Veränderung von Enzymen, die Verwendung von katalytischen Antikörpern und von Ribozymen sind auch zusätzliche Möglichkeiten, das Spektrum an biologischen, präparativ nützlichen Katalysatoren zu erweitern. Außerdem ein Screening nach neuen Enzymen wurde eventuell noch weitere synthetische Route bieten.

Eine der bemerkenswerten Eigenschaften der biologischen Katalysatoren besteht darin, dass sie sich evolutiv weiterentwickeln können. Enzyme haben sich in Verlauf von mehr als vier Milliarden Jahren entwickelt, um leistungsvolle Katalysatoren für physiologische Prozesse zu werden. Durch neue Techniken der Molekularbiologie können Enzyme heute zu maßgeschneiderten Biokatalysatoren weiterentwickelt werden.<sup>189,190</sup>



## 8. Experimenteller Teil

### Geräte und Reagenzien

#### NMR-Spektroskopie

$^1\text{H}$ -NMR	300 MHz Varian VXR 300, Gemini 300 500 MHz Varian Unity 500
$^{13}\text{C}$ -NMR	75.4 MHz: Varian VXR 300, Gemini 300 125.6 MHz: Varian Unity 500

#### Massenspektrometrie

Finnigan MAT 212, EI 70eV  
Finnigan MAT 95

#### IR-Spektroskopie

Perkin Elmer FT/IR 1720 X  
Perkin Elmer FT/IR 1750

#### Elementaranalyse

Heraeus CHN-O-Rapid

#### Schmelzpunkte

Büchi 535

#### Ozongenerator

Ozongenerator Fischer 502

#### Ultraschall

Sonorex TK 52 H, Bandelin

#### Photometer

Ultrospec Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB

### pH-Meter

Calimatic 761, Knick

### Chromatographie

Kieselgel 60, Korngröße 63-100  $\mu\text{m}$  und 40-63  $\mu\text{m}$ , Merck

Aktivkohle, pulverisiert, Merck

Kieselguhr Celite 535, Fluka

### Ionentauscher

- Kationtauscher:
- AG 50 WX8 ( $\text{H}^+$ , 100-200 mesh), Bio-Rad
  - Dowex 50 WX8 pract. ( $\text{H}^+$ , 100-200 mesh), Serva
  - Dowex 50 WX8 analyt. ( $\text{Na}^+$ , 100-200 mesh), Serva

- Aniontauscher:
- AG 1-X8 (Acetat, 100-200 mesh), Bio-Rad
  - Dowex 1X8 pract. ( $\text{Cl}^-$ , 100-200 mesh), Serva
  - Dowex 1X8 analyt. ( $\text{Cl}^-$ , 100-200 mesh), Serva

### Reaktionskontrolle

DC-Alufolien Kieselgel 60 F254, Merck

Detektion durch Benetzen mit

- Anisaldehydreagenz (200 ml Ethanol, 5.5 ml Anisaldehyd, 7.45 ml Schwefelsäure, 2.24 ml Essigsäure)
- Phosphomolybdänsäure (10 g Phosphomolybdänsäure in 100 ml Ethanol)
- 2,4-Dinitrophenylhydrazin in verdünnter Salzsäure
- Cersulfat-Ammoniummolybdat-Lösung (24g Ammoniummolybdat, 1g Cer(III)-sulfat, 500 ml 10proz. Schwefelsäure)
- Ninhydrin-Lösung (300 mg Ninhydrin, 100 ml Butanol, 3ml Eisessig)
- Kaliumpermanganat (250 mg Kaliumpermanganat in 50 ml 1M Natronlauge)

und anschließendes Erhitzen im Heizluftstrom.

### Zentrifuge

Sorvall Superspeed RC2-B, DuPont

## **Produktion von FruA aus *Staphylococcus carnosus***

Die gentechnischen Arbeiten erfolgen nach Literatur-Standardprotokollen.<sup>191</sup>

Alle Lösungen und Geräte werden vor Gebrauch 20 Minuten bei 121°C sterilisiert.

### **Geräte**

#### Autoklav

Dampfsterilisator VST 50/70

#### Disintegrator

Disintegrator-S, Fa. Biomatik

#### Dialyseschlauch

Servapor<sup>®</sup> Dialysis Tubing, 29 mm

#### Durchlaufzentrifuge

Heraeus 8575

#### Fermenter

Biostat B, Fa. Braun

#### Peristaltikpumpen

Pump P1, Fa. Pharmacia

Watson Marlow 505 U

#### Proteinchromatographie

SuperFlo<sup>®</sup>-50, -250 Column, Fa. Sephagen Co.

DEAE-Sephrose Cl-6-B, Fa. Pharmacia

GPC: Sphadex G 150, Fa. Pharmacia

Säule: 6 \* 75 cm, 2120 cm<sup>3</sup>

#### Reinstwasser

MilliQue Plus, Fa. Millipore

Spektrophotometer

Pharmacia LKB Ultrospec Plus  
mit dem Schreiber Pharmacia LKB

Ultrafiltration

Amicon 8400  
Membran YM 10

UV-Detektor

Pharmacia Uvicord S II

Zellaufschluß

IMA-Zelldesintegrator C

Zentrifuge

Heraeus Biofuge 28 RS mit Durchflußrotor  
Sorvall Superspeed RC2-B, DuPont  
Eppendorf Zentrifuge 5415 C

**Bakterienstämme**

JM 105	Fa. Pharmacia
<i>Eco sure</i> <sup>TM</sup>	Fa. Stratagene

**Medien**

LB (1 Liter):	10 g Pepton
	10 g NaCl
	5 g Hefeextrakt

LBA (1 Liter):	LB nach Sterilisieren Zugabe von 0.2 g Ampicillin
----------------	---

SOB (1 Liter):  
20 g Pepton  
5 g Hefeextrakt  
0.5 g NaCl  
10 ml einer 250 mM KCl-Lösung  
5 ml einer 2M MgCl<sub>2</sub>- Lösung  
pH 7.0

Für Agar-Platten werden vor dem Sterilisieren 1.5 g Agar pro 100 ml Medium zugesetzt.

Für eine Standardfermentation

100 g Pepton  
50 g NaCl  
50 g Hefeextrakt  
mit 9.8 l Wasser auffüllen

Nach 20 minütigen Sterilisieren bei 121°C werden 1 g Ampicillin (gelöst in 50 ml heißem Wasser) zugegeben. Die Eichung der Sauerstoffelektrode erfolgt anhand des frisch autoklavierten und noch nicht bewegten Mediums (Nullwert) und dem normal begasten und gerührten Medium vor dem Animpfen (100 %-Wert). Die pH-Elektrode wird vor dem Einbau mit den entsprechenden Eichpuffern geeicht.

Antifoam: Olivenöl (handelsüblich, kaltgepresst)

### **Puffer**

TM-Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7.2  
10 mM 2-mercaptoethanol

### **Vektor**

pKK223-3 Fa. Pharmacia

**Elektrophorese**

Trenngel (12%):	6.0 ml Acrylamid (40 % (w / v)), Bisacrylamid (1% (w / v)) 5.0 ml 1.5 M Tris-HCl, pH 8.9 8.9 ml Wasser 200 µl SDS (10%) 20 µl TMDA 150 µl Peroxodisulfat-Lösung (0.1 g/ml)
Sammelgel (5%):	625 µl Acrylamid (40 % (w / v)), Bisacrylamid (1% (w / v)) 1.3 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 5 ml Wasser 70 µl SDS (10%) 10 µl TMDA 50 µl Peroxodisulfat-Lösung (0.1 g/ml)
Probepuffer:	2 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 2 ml Glycerin 2 ml SDS (2 % (w / v)) 1 ml 2-Mercaptoethanol 1 ml Bromphenolblau-Lösung (20 ml / 100 ml Wasser)
Elektrophoresepuffer: (1 Liter)	6 g Tris-HCl, pH 8.5 28.8 g Glycin 1 g SDS
Färbelösung:	500 ml Methanol 100 ml Essigsäure 400 ml Wasser 400 mg Servablau

Entfärbelösung:           300 ml Methanol  
                                  100 ml Essigsäure  
                                  600 ml Wasser

### **Assaylösungen für die Aldolasen**

FucA-Aktivität:           100 ml Assaylösung:  
                                  728 mg Tris-HCl, pH 7.5  
                                  448 mg Kaliumchlorid  
                                  106 mg L-Fucose-1-phosphat (CHA-Salz)  
                                  15.26 mg NADH (0.2 µmol/ml)

FruA-Aktivität:           100 ml Assaylösung:  
                                  728 mg Tris-HCl, pH 7.5  
                                  448 mg Kaliumchlorid  
                                  170 mg D-Fructose-1,6-bisphosphat (Na<sub>3</sub>-Salz)  
                                  15.26 mg NADH (0.2 µmol/ml)

RhuA-Aktivität:           100 ml Assaylösung:  
                                  728 mg Tris-HCl, pH 7.5  
                                  448 mg Kaliumchlorid  
                                  106 mg L-Rhamnose-1-phosphat (CHA-Salz)  
                                  15.26 mg NADH (0.2 µmol/ml)

### **Assay für FucA, FruA und RhuA**

0.5 ml Assaylösung werden in einer Eppendorf-K-Küvette auf 25°C temperiert und mit 1.5 µl einer GDH-suspension (1U) versetzt. Anschließend werden 10 µl der Aldolaselösung zupipetiert, kurz umgeschwenkt und sofort der Absorptionsverlauf der Abnahme der NADH-Konzentration bei 340 nm mit einem Schreiber aufgezeichnet. Die Aktivität wird aus der Steigung der Geraden graphisch bestimmt. 1 Unit ist definiert als die Enzymmenge, die unter den Reaktionsbedingungen 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt.

### **SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Trenn- und Sammelgel werden jeweils in einem Becherglas gemischt. Der Katalysator TMEDA und der Radikalstarter Peroxodisulfat werden jeweils zuletzt zugegeben und die Lösungen sofort blasenfrei in die Gelkammer gegossen. Das Trenngel sollte bis ca. 2.5 cm unter den Rand der Kammer reichen. Man überschichtet das Trenngel mit 1 ml wassergesättigtem *iso*-Butanol und läßt es bei Raumtemperatur gelieren. Der *iso*-Butanol wird anschließend mit einem Filterpapier abgesaugt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesteckt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert ist, wird die Gelkammer in die gekühlte Elektrophoreseapparatur eingespannt, der Elektrodenpuffer so hoch eingefüllt, dass das Gel jeweils eintaucht, und der Kamm vorsichtig entfernt.

10 µl der Proteinproben werden mit 15 µl Probenpuffer versetzt und 10 Min. bei 100°C vollständig denaturiert. Anschließend werden die Proben kurz zentrifugiert und 15 µl der Proben mit einer µl-Spritze in die Taschen gefüllt.

Bei einer Grenzspannung von 400 V und einem Grenzstrom von 40 mA wird die Elektrophorese so lange durchgeführt, bis die blaue Markerbande ca. 0.5 cm vom unteren Rand des Gels entfernt ist. Das Gel wird vorsichtig aus der Kammer genommen und ca. 30 min. in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend wird das Gel unter mehrmaligen Wechseln der Entfärbelösung gewaschen und im Vakuum zwischen zwei Einmachhäuten getrocknet.

### **Fermentation**

Die Fermentation wird in drei Schritten nach Standardprotokoll durchgeführt. Nach Ausstreichen eines Rasens wird eine 200 ml Schüttelkultur beimpft, die nach 6 Stunden zum Animpfen des Fermenters dient. Die Luftmenge wird auf 6 l/min einregelt. Die Rührergeschwindigkeit beträgt 600 rpm. Nach 4 Stunden wird mit 0.5 mM IPTG induziert und die Zellen nach weiteren 10 Stunden mit Hilfe der durchlaufzentrifuge bei 20000 g abgeerntet. Das Zellpellet kann in Gefrierbeuteln bei -18°C gelagert werden.



**Aufreinigung der FruAsca**

Die erhaltenen 55 g Zellen werden im Präparationspuffer resuspendiert (20 prozentige Suspension), mit 10000 U Benzonase versetzt und mittels einer Kugelmühle mit Glasperlen zweimal aufgeschlossen. Dazu werden 100 ml der Glasperlen (0.1-0.2 mm) mit ca. 150 ml der Suspension verrührt und 15 Minuten bei 0°C und 4000 rpm gerührt. Die Glasperlen werden über eine D-2-Fritte abgetrennt. Nachdem der Zelldebris durch 60 minütiges Zentrifugieren bei 24000 g abgetrennt wurde, wird das Rohextrakt auf eine DEAE-SuperFlo<sup>TM</sup>-Säule aufgetragen. Ein Teil des Fremdproteins wird durch Spülen der Säule mit einem 100 mM NaCl-Puffer abgetrennt. Zur Elution der FruAsca wird ein NaCl-gradient von 100 bis 400 mM NaCl angelegt. Die FruAsca wird bei ca. 300 mM NaCl eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität werden vereinigt und durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 70% gefällt. Der Niederschlag wird durch 30 minütiges Zentrifugieren abgetrennt und im Präparationspuffer wieder aufgenommen (ca 3 % Sättigung). Die so erhaltene Suspensionen besitzen eine Aktivität von ca 73 U / ml.

## Allgemeine Arbeitsvorschriften

### AAV1: Barbier-Typ Allylierung

5 mmol des Ketons oder des Diketons wird mit 1 Volumenteil THF und 4 Volumenteilen gesättigter wässriger  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung versetzt. Bei Löslichkeitsproblemen kann bis zur vierfachen Menge Essigester und THF verwendet werden. Es werden 2 bis 4 Äquivalente Zink-Staub zugegeben und unter heftigem Rühren 2 bis 4 Äquivalente Allylbromid langsam zugetropft, so dass die Temperatur der Mischung nicht  $50^\circ\text{C}$  überschreitet. Es wird ungefähr 3 Stunden bei RT rühren lassen. Bei unvollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird länger gerührt und zusätzlich 1 Äquivalent Allylbromid zugegeben.

Der anorganische Niederschlag wird abgesaugt und gründlich mit Essigester gewaschen. Die vereinigten flüssigen Phasen werden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit dem dreifachen Volumen Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt.

### AAV2: Ozonolyse

In eine 10-500 mM Lösung des Olefins in Methanol (ca 1% Wassergehalt) wird bei  $-78^\circ\text{C}$  Ozon eingeleitet. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird überschüssiges Ozon durch Einleiten von Luft ausgetrieben. Unter Rühren wird Dimethylsulfid zugetropft (0.5 ml pro 1 mmol Olefin). Die Lösung wird langsam aufgetaut und bei Raumtemperatur stehen gelassen (3-5 h). Dann wird Wasser zugegeben und die Lösung wird im Vakuum eingeengt. Der verbleibende Sirup wird dreimal in Methanol gelöst und erneut im Vakuum eingeengt. Die Carbonylverbindungen enthalten wechselnde Anteile Dimethylsulfoxid und werden ohne Reinigung für weitere chemische oder enzymatische Reaktionen eingesetzt.

### AAV3: Enzymatische Aldoladdition

Der in wenig Wasser gelöste Aldehyd wird mit einer wässrigen Lösung von DHAP (80-100 mM; aus G3P hergestellt) auf pH 6.8-7.3 eingestellt und Aldolase (FruA, RhuA oder FucA; 80-160U pro 1 mmol Aldehyd) zugesetzt. Der Reaktionsverlauf wird durch DC (*iso*-Propanol:Ammoniak:Wasser = 6:3:2) kontrolliert. Nach beendeter Reaktion wird Aktivkohle zugegeben und die Lösung wird auf Kieselguhr filtriert, um das Enzym zu entfernen.

**AAV4                    Enzymatische Dephosphorylierung**

Eine 20-100 mM Lösung des rohen Ketosephosphats wird auf pH 7.5 eingestellt und mit 80-200 U/mmol alkalischer Phosphatase versetzt. Nach vollständigem Umsatz (1-4d) wird über Aktivkohle filtriert (für aliphatische Substrate) und die Lösung durch Filtration über Ionentauscher ( $\text{HCO}_3^-$ - und  $\text{H}^+$ -Form) entsalzt. Wenn das Produkt einen aromatischen Rest enthält wird die Lösung mit Natriumchlorid gesättigt und dreimal mit Essigester extrahiert. Die Lösung wird im Vakuum konzentriert und der verbleibende Sirup an Kieselgel chromatographiert.

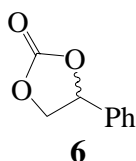
## Synthesen

### Enzymatische Hydrolyse des Carbonats zum Diol

95 mg (0.5 mmol) Substrat werden in 1 ml Lösungsmittel (DMSO, *t*-Butanol, Isopropanol, Anisol, Chloroform) gelöst. 10 ml Phosphatpuffer (0.1 M, pH=7.4) und das Enzym werden noch zugegeben. Das Gemisch wird bei RT in geschlossenem Kolben 7 Tage gerührt.

Versuche mit	25 mg	PLE (Sigma E2884)
	25 mg	Lipase PS (Amano)
	150 µl	Esterase E-1
	5 bis 100 mg*	L-1, L-2, L-3, L-4, L-5, L-6, L-7, L-8
	*(nach Angaben von Boehringer M.)	

### das Carbonat 6



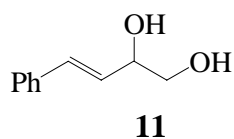
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 4.34 (dd,  $J_{1a-2}=7.89$ ,  $J_{\text{gem}}=8.56$ , H-1a), 4.80 (dd,  $J_{1b-2}=8.39$ ,  $J_{\text{gem}}=8.56$ , H-1b), 5.68 (t,  $J_{2-1}=8.06$ , H-2), 7.33-7.47 (m, 5H, Aromat-H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 71.23 (C-1), 78.09 (C-2), 126.0-130.0 (5C, Aromat-C), 135.94 (3C, quat. Aromat-C), 155.11 (C=O).

$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$       164.16

**4-Phenyl-3-buten-1,2-diol 11**

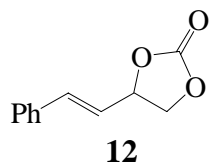
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 3.55, 3.69 (dd, AB,  $J_{4a-3}=3.43$ ,  $J_{4b-3}=7.83$ ,  $J_{\text{gem}}=11.26$ , 2H, H-4a, H-4b), 4.39 (m, H-3), 4.20 (s, 2H, OH), 6.13 (dd,  $J_{2-3}=6.18$ ,  $J_{2-1}=16.18$ , 1H, H-2), 6.61 (dd,  $J_{1-3}=0.96$ ,  $J_{1-2}=16.18$ , 1H, H-1), 7.10-7.35 (m, 5H, Aromat-H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 66.46 (C-4), 73.22 (C-3), 126.6 (C-2), 127-128 (4C, Aromat-C), 131.71 (C-1).

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$       164.20

**das Carbonat 12**

$^1\text{H-NMR}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 4.24, 4.65 (AB, 2dd,  $J_{4a-3}=7.7$ ,  $J_{4b-3}=7.9$ ,  $J_{\text{gem}}=8.4$ , 2H, H-4), 5.30 (ddd,  $J_{3-1}=0.7$ ,  $J_{3-4}=7.7$ ,  $J_{3-2}=15.8$ , 1H, H-3), 6.18 (dd,  $J=8.1$ ,  $J_2=15.8$ , 1H, H-2), 6.79 (d,  $J_{1-3}=15.8$ , 1H, H-1), 7.29-7.44 (m, 5H, Aromat-H).

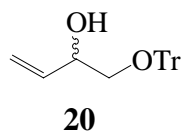
$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 69.36 (C-4), 77.85 (C-3), 122.37 (C-2), 127.01, 128.85, 129.14 (5C, Aromat-C), 134.83 (3C, quat. Aromat-C), 136.82 (C-1), 154.86 (C=O).

$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_3$       190.20

**Enzymatische Acetylierung von 20**

165 mg (0.5 mmol) Substrat **20** wird in 1 mL Vinylacetat gelöst und mit 50 mg Lipase versetzt. Das Gemisch wird 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt.

**1-Trityloxy-3-buten-2-ol 20**

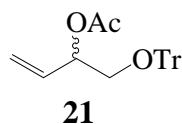
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 3.22, 3.11 (AB, 2dd,  $J_{4a-3}$  = 4.0,  $J_{4b-3}$  = 7.5,  $J_{\text{gem}}$  = 9.4, 2H, H-4), 4.28 (m, 1H, H-3),  
 5.15 (dt,  $J_{\text{gem}}$  =  $J_{1a-3}$  = 1.4,  $J_{1a-2}$  = 10.5, 1H, H-1a),  
 5.29 (dt,  $J_{\text{gem}}$  =  $J_{1b-3}$  = 1.4,  $J_{1b-2}$  = 17.5, 1H, H-1b),  
 5.80 (ddd,  $J_{2-3}$  = 5.7,  $J_{2-1b}$  = 10.5,  $J_{2-1a}$  = 17.5, 1H, H-2), 7.21-7.33 (m, 9H, arom. H),  
 7.43 (m, 6H, arom. H)

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 67.46 (C-4), 72.03 (C-3), 86.81 (OC- $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 116.32 (C-1), 127-128 (15C, arom. C),  
 137.03 (C-2), 143.80 (3C, quat. arom. C)

$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_2$       330.42

**2-O-Acetyl-1-Trityloxy-3-buten 21**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

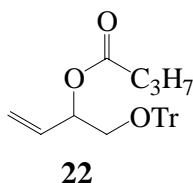
$\delta$  = 2.10 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.16, 3.24 (AB, 2dd,  $J_{4a-3}$  = 4.0,  $J_{4b-3}$  = 6.7,  $J_{\text{gem}}$  = 9.7, 2H, H-4),  
 5.18 (dt,  $J_{\text{gem}}$  =  $J_{1a-3}$  = 1.3,  $J_{1a-2}$  = 10.4, 1H, H-1a),  
 5.26 (dt,  $J_{\text{gem}}$  =  $J_{1b-3}$  = 1.3,  $J_{1b-2}$  = 17.5, 1H, H-1b), 5.50 (m, 1H, H-3),  
 5.80 (ddd,  $J_{2-3}$  = 6.0,  $J_{2-1b}$  = 10.5,  $J_{2-1a}$  = 17.0, 1H, H-2), 7.17-7.33 (m, 9H, arom. H),  
 7.44 (m, 6H, arom. H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 21.16 ( $\text{CH}_3$ ), 65.19 (C-4), 73.62 (C-3), 86.51 ( $\text{OC-C}_6\text{H}_5$ ), 117.78 (C-1),  
126-128 (15C, arom. C), 133.54 (C-2), 143.79 (3C, quat. arom. C), 170.12 (C=O)

$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_3$       372.46

### 1-*O*-Trityl-2-*O*-butyratbuten **22**



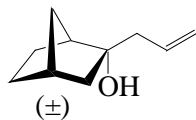
$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 0.97 (t,  $J$ =7.38, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.71 (qt,  $J$ =7.38, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.37 (t,  $J$ =7.39, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  
3.15, 3.23 (dd, AB,  $J_{4a-3}$ =4.03,  $J_{4b-3}$ =7.05,  $J_{\text{gem}}$ =9.74, 2H, H-4),  
5.17 (dt,  $J_{1-3}$ = 1.35,  $J_{1\text{cis}-2}$ =10.75, 1H, H-1cis),  
5.26 (dt,  $J_{1-3}$ = 1.35,  $J_{1\text{trans}-2}$ =17.12, 1H, H-1trans), 5.53 (m, 1H, H-3),  
5.80 (ddd,  $J_{2-3}$ =6.04,  $J_{2-1\text{cis}}$ =10.74,  $J_{2-1\text{trans}}$ =17.12, 1H, H-2),  
7.18-7.32 (m, 10H, arom. H), 7.40-7.46 (m, 15H, arom. H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 13.75 ( $\text{CH}_3$ ), 18.50, 36.47, 65.25 ( $\text{CH}_2$ ), 73.37 (C-3), 86.50 ( $\text{OC-C}_6\text{H}_5$ ), 117.66 (C-1),  
127-130 (15C, arom. C), 133.69 (C-2), 143.84 (3C, quat. arom. C), 172.77 (C=O)

$\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_3$       400.52

**2-Allyl-2-endo-norbornanol 24****24**

Allylierung von Norcampher mit Allylbromid / Zink nach **AVV 1**.

Ansatz : 5 g (4.54 mmol) Norcampher **23**

Ausbeute : 5.80 g (84%) **24** als gelber Sirup nach Chromatographie an Kieselgel  
(Cyclohexan : Essigester = 3:1)

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 5.90 (ddt, 1H, AB, H-9), 5.17 (m, 2H, H-10), 1.00-2.40 (m, 12H).

$J_{9-8}=7.4$ ,  $J_{9-10a}=10.4$ ,  $J_{9-10b}=16.8$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 134.07 (=CH), 119.0 (=CH<sub>2</sub>), 78.40 (C-OH quat.), 46.67 (CH<sub>2</sub>), 46.35 (CH),

45.24, 38.58 (CH<sub>2</sub>), 37.20 (CH), 28.53, 22.12 (CH<sub>2</sub>).

MS (EI; m/z (%)):

152 (27)  $[\text{M}]^+$ , 137 (47)  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ , 111 (100)  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_5]^+$ , 93 (34)  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_5-\text{H}_2\text{O}]^+$ ,

83 (31)  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_5\text{O}]^+$ , 67 (61)  $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_9\text{O}]^+$ , 55 (41)  $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_9\text{O}]^+$ .

$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$  152.24

**(5-Desoxy-D-fructose)-6-*spiro*-2'-norbornan 25A, 25B**

(5-Desoxy-D-*arabino*-hexulose)-6-*spiro*-2'-norbornan

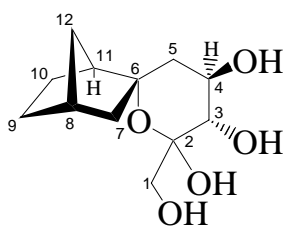
1.) Ozonolyse von 2-Allyl-2-norbornanol nach **AVV 2**,

2.) enzymatische Aldoladdition nach **AVV 3** und

3.) enzymatische Dephosphorylierung nach **AVV 4**.



- Ansatz :                    1.) 0.7 g (5 mmol) 2-Allyl-2-*endo*-norbornanol **24**  
                                  2.) 2x2.5 mmol DHAP, 2x200 U FruA<sub>Sca</sub> (4d)  
                                  3.) 500 U Pase (3d)
- Ausbeute :                420 mg (34%) von dem Gemisch 25A und 25B als farbloser Feststoff  
                                  nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol : Wasser  
                                  = 50:10:1)

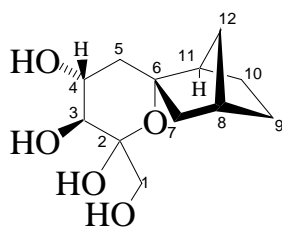
**25A**

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):

$\delta$  = 4.02 (ddd, 4-H), 3.65 (d, 1-H<sub>a</sub>), 3.49 (d, 1-H<sub>b</sub>), 3.43 (d, 3-H), 2.51 (d, 11-H),  
 2.22 (q, 5-H<sub>eq</sub>), 2.09 (d, 8-H), 1.79 (m, 10-H<sub>endo</sub>), 1.60-1.54 (m, 7-H<sub>exo</sub>), 1.53 (m, 5-H<sub>ax</sub>),  
 1.50 (m, 9-H<sub>exo</sub>), 1.45 (m, 12-H<sub>a</sub>), 1.38-1.29 (m, 10-H<sub>exo</sub>), 1.29 (m, 7-H<sub>endo</sub>),  
 1.29 (d, 12-H<sub>b</sub>), 1.20 (m, 9-H<sub>endo</sub>).  
 $J_{4-3} = 9.77$ ,  $J_{4-5eq} = 4.58$ ,  $J_{4-5ax} = 11.70$ ,  $J_{5ax-5eq} = 13.12$ ,  $J_{1a-1b} = 11.29$ ,  $J_{11-12} = 3.97$ ,  
 $J_{8-12} = 4.27$ .

<sup>13</sup>C-NMR (125.6 MHz, D<sub>2</sub>O):

$\delta$  = 101.59 (C-2), 85.72 (C-6), 75.07 (C-3), 69.10 (C-4), 66.56 (C-1), 49.15 (C-7),  
 48.16 (C-11), 46.22 (C-5), 40.68 (C-12), 37.20 (C-8), 30.75 (C-9), 25.17 (C-10).

**25B**

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):

$\delta$  = 3.99 (dd, 4-H), 3.61 (d, 1- $\text{H}_a$ ), 3.44 (d, 1- $\text{H}_b$ ), 3.43 (d, 3-H), 2.21 (d, 11-H), 2.06 (d, 8-H), 2.02 (m, 9- $\text{H}_{exo}$ ), 2.11 (dd, 5- $\text{H}_{eq}$ ), 1.69-1.60 (m, 7- $\text{H}_{exo}$ , 7- $\text{H}_{endo}$ ), 1.54 (m, 5- $\text{H}_{ax}$ ), 1.50 (m, 10- $\text{H}_{exo}$ ), 1.47 (m, 12- $\text{H}_a$ ), 1.29 (m, 9- $\text{H}_{endo}$ ), 1.24 (m, 10- $\text{H}_{endo}$ ), 1.19 (d, 12- $\text{H}_b$ ).  $J_{4-3} = 9.77$ ,  $J_{4-5eq} = 4.27$ ,  $J_{4-5ax} = 11.60$ ,  $J_{5ax-5eq} = 12.51$ ,  $J_{1a-1b} = 11.60$ ,  $J_{11-12} = 4.27$ ,  $J_{8-12} = 3.06$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):

$\delta$  = 101.33 (C-2), 84.37 (C-6), 75.27 (C-3), 67.87 (C-4), 67.12 (C-1), 51.72 (C-8), 46.86 (C-5), 44.72 (C-7), 39.73 (C-11), 38.07 (C-12), 31.18 (C-10), 23.51 (C-9).

MS (SIMS, DTE/DTT/Sul;  $m/z$  (%)) :

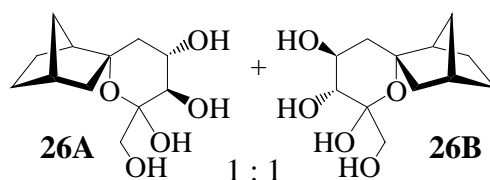
251.1 (29.7)  $[\text{M}+\text{Li}]^+$ , 149.0 (33.5)  $[\text{M}-(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_4)+\text{Li}+2\text{H}]^+$ , 132.9 (100)

$[\text{M}-(\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_4)+\text{Li}]^+$ , 103.0 (53.7)  $[\text{M}-(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_5)+\text{Li}]^+$ .

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_5$  244.20

**(5-Desoxy-D-sorbose)-6-*spiro*-2'-norbornan 26A, 26B**

(5-Desoxy-D-xylo-hexulose)-6-*spiro*-2'-norbornan



1.) Ozonolyse von 2-Allyl-2-*endo*-norbornanol **24** nach **AVV 2**,

2.) enzymatische Aldoladdition nach **AVV 3** und

3.) enzymatische Dephosphorylierung nach **AVV 4**.

Ansatz : 1.) 0.7 mg (5 mmol) 2-Allyl-2-norbornanol  
 2.) 2x2.5 mmol DHAP, 2x200 U RhuA (4d)  
 3.) 500 U Pase (3d)

Ausbeute : 400 mg (33%) von dem Gemisch 26A und 26B als farbloser Feststoff  
 nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol : Wasser  
 = 20:10:1)

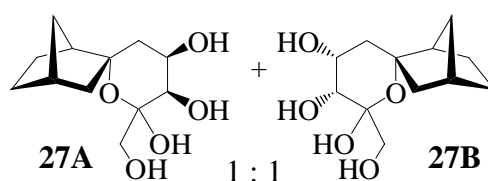
MS (SIMS, DTE/DTT/Sul; m/z (%)) :

251.0 (100)  $[M+Li]^+$ , 104.0 (37)  $[M-(C_5H_8O_5)+Li]^+$ .

$C_{12}H_{20}O_5$  244.20

**(5-Desoxy-D-psicose)-6-*spiro*-2'-norbornan 27A, 27B**

(5-Desoxy-D-*ribo*-hexulose)-6-*spiro*-2'-norbornan



- 1.) Ozonolyse von 2-Allyl-2-*endo*-norbornanol **24** nach **AVV 2**,
- 2.) enzymatische Aldoladdition nach **AVV 3** und
- 3.) enzymatische Dephosphorylierung nach **AVV 4**.

Ansatz : 1.) 0.7 mg (5 mmol) 2-Allyl-2-norbornanol  
 2.) 2x2.5 mmol DHAP, 2x200 U FucA (4d)  
 3.) 250 U Pase (3d)

Ausbeute : 200 mg (17%) von dem Gemisch 27A und 27B als farbloser Feststoff  
 nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol : Wasser  
 = 50:10:1)

MS (FD; m/z (%)) :

244 (100)  $[M]^+$ , 227 (29.2)  $[M-OH]^+$ , 208 (22.4)  $[M-(H_2O)_2]^+$ , 152 (11.6)  $[M-(CH_2O)_2]^+$ ,  
 111 (20.4)  $[M-(C_5H_9O_4)]^+$ .

C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>

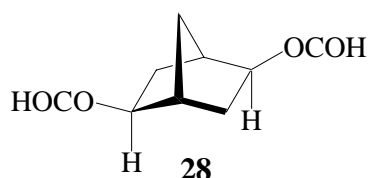
244.20

***exo, exo*-Bicyclo[2.2.1]heptan-2,5-diformiat **28****

Veresterung von Norbornandien

In einem 500 ml Rundhalskolben werden 131 ml 99%ige Ameisensäure (3.47 mol = 8eq) und 40 g (0.43 mol) Norbornandien über Nacht unter Rückfluß gerührt. Der Verlauf der Reaktion wird durch DC (Cyclohexan : Ethylacetat = 3:1) verfolgt.

Nach Reaktionsende wird die überschüssige Ameisensäure i. Vak. (30°C, 40 mbar) entfernt und durch Destillation bei 145°C und 31 mbar 75 g (95%) Diformiat **28** erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 8.10-8.00 (m, 2H, HCOOR), 4.60-5.20 (m, 2H, 2-H, 5-H), 2.36-2.59 (m, 2H, 1-H, 4-H), 0.90-1.88 (m, 6H, 3-H<sub>2</sub>, 6-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 160.8 (HCOOR), 80.8-73.2 (C-2, C-5), 43.8-38.4 (C-1, C-4), 37.4-31.3 (C-3, C-6), 25.3-21.9 (C-7).

C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>

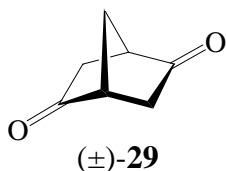
184.19

**2,5-Norbornandion (Bicyclo[2.2.1]heptan-2,5-dion) **29****Jones Oxidation von **28** zum 2,5-Norbornandion **29**

Zu einer eisgekühlten Lösung aus 70 g (0.38 mol) Diformiat in 150 ml Aceton in 500 ml Dreihalskolben wird langsam eine wässrige Lösung 8N Chromsäure (374 ml, hergestellt aus 106 g CrO<sub>3</sub>, 88 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 400 ml Wasser) zugetropft, so dass die Temperatur 30°C nicht übersteigt. Nachdem die Lösung eine orange-braune Färbung annimmt, wird noch ein geringer Überschuß des Oxidationsmittels zugegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei

RT gerührt, bis im DC kein Fortschreiten der Reaktion mehr zu erkennen ist. Um das überschüssige Oxidationsmittel zu reduzieren, wird eine Natriumhydrogensulfit-Lösung zugegeben. Das entstandene dunkelgrüne Chromsulfat wird abfiltriert und mit Dichlormethylen gewaschen. Das Filtrat wird i. Vak eingengt. Durch Sublimation wurde keine höhere Reinheit erreicht.

Ausbeute : 18.5 g (39%) von **29** als farloser Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 5.31 (s, 1H, 3-H od. 6-H (Enol)), 3.01 (dt, 2H, 1-H, 4-H), 2.40 (dd, d 2H, 3- $\text{H}_{\text{exo}}$ , 6- $\text{H}_{\text{exo}}$ ), 2.20-2.10 (m, 4H, 3- $\text{H}_{\text{endo}}$ , 6- $\text{H}_{\text{endo}}$ , 7- $\text{H}_2$ ), 1.78 (m, 1H, OH/Enol).

$J_{1-7} = J_{4-7} = 1.67$ ,  $J_{1-6} = J_{3,4} = 4.36$ ,  $J_{\text{exo-endo}} = 18.13$

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 212.35 (C-2, C-5), 48.61 (C-1, C-4), 38.95 (C-3, C-6), 36.43 (C-7).

MS (EI; m/z (%)):

124.0 (39.3)  $[\text{M}]^+$ , 107.9 (13.9)  $[\text{M-O}]^+$ , 98.0 (28.0)  $[\text{M-2O+2H}_2]^+$ ,  
82.0 (58.1)  $[\text{M-C-2O+2H}]^+$ , 67.0 (81.8)  $[\text{M-(C}_2\text{HO}_2)]^+$ , 55.0 (84.4)  $[\text{M-(C}_3\text{HO}_2)]^+$ ,  
41.0 (100)  $[\text{M-(C}_4\text{H}_3\text{O}_2)]^+$ .

$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$  124.14

### 2,5-Diallyl-2,5-*exo, exo*-norbornandiol **30**

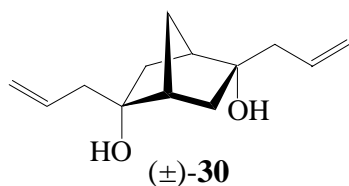
### 5-Allyl-5-*endo*-hydroxy-bicyclo[2.2.1]heptan-2-one **31**

Allylierung von 2,5-Norbornandion **29** mit Allylbromid / Zink nach **AVV 1**.

Ansatz : 5 g (40.3 mmol) Norbornandion **29**

Ausbeute : nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 3:1)

2.7 g (35%) 2,5-Diallyl-2,5-*exo, exo*-norbornandiol **30** als gelber Sirup  
und 0.95 g (14%) 5-Allyl-5-*endo*-hydroxy-bicyclo[2.2.1]heptan-2-one  
**31** als gelber Sirup



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 6.10-5.70 (ddt, 2-, 2'-H), 5.15 (d, 1- $\text{H}_a$ ), 5.10 (d, 1- $\text{H}_b$ ), 2.70 (bs, OH),  
2.40-2.20 (dd, 3-, 3'-H), 2.12 (d, 6-, 6'-H), 1.84 (dt, 5, 5'- $\text{H}_{exo}$ ),  
1.60-1.40 (m, 7-H, und d, 5-, 5'- $\text{H}_{endo}$ ).  
 $J_{1cis-2}=10.71$ ,  $J_{1trans-2}=16.76$ ,  $J_{2-3}=7.14$ ,  $J_{5-6}=4.12$ ,  $J_{5exo-5endo}=13.46$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 134.18 (C-2, C-2'), 118.59 (C-1, C-1'), 77.53 (C-4, C-4'), 47.68 (C-6, C-6'),  
46.41 (C-3, C-3'), 39.46 (C-5, C-5', C-7).

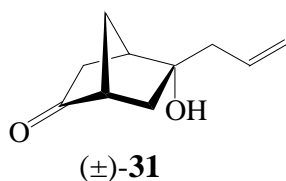
MS (FI;  $m/z$  (%)):

209 (59.8)  $[\text{M}+1]^+$ , 191 (8.8)  $[\text{M}-\text{OH}]^+$ , 168 (100)  $[\text{M}-\text{CO}_2+2\text{H}_2]^+$ .

MS (EI;  $m/z$  (%)):

208.4 (0.4)  $[\text{M}]^+$ , 167.2 (61.4)  $[\text{M}-\text{CO}_2+\text{H}_3]^+$ , 149.1 (79.9)  $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$ ,  
131.1 (29.3)  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_9\text{O}_2]^+$ , 121.1 (61.2)  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2]^+$ , 106.3 (68.4)  $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$ ,  
91.1 (57.9)  $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_2]^+$ , 79.2 (100)  $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2]^+$ .

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_2$                       208.30

5-Allyl-5-*endo*-hydroxy-bicyclo[2.2.1]heptan-2-one **31**

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 5.98-5.86 (ddt, 2-H), 5.24 (d, 1- $\text{H}_{\text{cis}}$ ), 5.20 (d, 1- $\text{H}_{\text{trans}}$ ), 2.65 (dd, 8- $\text{H}_{\text{exo}}$ ), 2.55 (d, 6-H), 2.52 (d, 9-H), 2.45 (dd, 3-H), 1.97 (dd, 5- $\text{H}_{\text{exo}}$ ), 1.93 (dd, 8- $\text{H}_{\text{endo}}$ ), 1.86 (ddt, 10-Ha), 1.77 (dt, 10Hb), 1.50 (dd, 5- $\text{H}_{\text{endo}}$ ).

$J_{1\text{cis}-2}=10.40$ ,  $J_{1\text{trans}-2}=17.02$ ,  $J_{1\text{cis}-3}=0.95$ ,  $J_{1\text{trans}-3}=1.26$ ,  $J_{2-3}=7.25$ ,  $J_6=5.04$ ,  $J_9=4.09$ ,  $J_{5\text{exo}-5\text{endo}}=13.55$ ,  $J_{5\text{exo}-6}=5.05$ ,  $J_{5\text{endo}-6}=3.15$ ,  $J_{8\text{exo}-8\text{endo}}=17.97$ ,  $J_{8\text{exo}-9}=4.41$ ,  $J_{8\text{endo}-9}=4.42$ ,  $J_{10\text{a}-10\text{b}}=11.03$ ,  $J_{10\text{a}-8\text{exo}}=3.16$ ,  $J_{10\text{a}-6}=J_{10\text{a}-9}=1.57$ ,  $J_{10\text{b}-5\text{exo}}=3.15$ ,  $J_{10\text{b}-6}=J_{10\text{b}-9}=1.57$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 218.45 (C-7), 133.90 (C-2), 120.88 (C-1), 77.96 (C-4), 52.05 (C-6), 47.42 (C-3), 46.06 (C-9), 41.95 (C-5), 40.13 (C-8), 37.29 (C-10).

MS (EI;  $m/z$  (%)):

166.0 (11.8)  $[\text{M}]^+$ , 151.0 (57.1)  $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_2]^+$ , 133.0 (43.7)  $[\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}]^+$ , 124.9 (62.2)  $[\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}]^+$ , 107.0 (41.2)  $[\text{C}_7\text{H}_7\text{O}]^+$ , 79.0 (100)  $[\text{C}_5\text{H}_3\text{O}]^+$ , 55.0 (83.1)  $[\text{C}_3\text{H}_3\text{O}]^+$ .

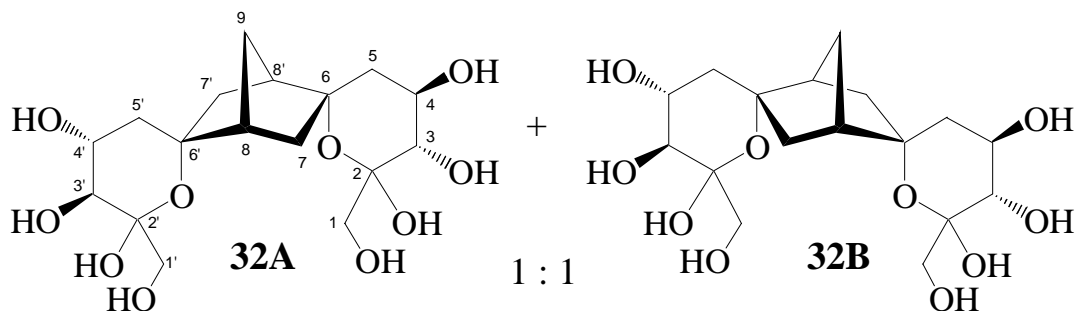
$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$                       166.22

**(5-Desoxy-D-fructose)-6-*spiro*-2'-norbornan-5'-*spiro*-6''-(5-desoxy-D-fructose) 32A, 32B**  
(5-Desoxy-D-*arabino*-hexulose-6-*spiro*-2'-norbornan-5'-*spiro*-6''-(5-desoxy-D-*arabino*-hexulose)

- 1.) Ozonolyse von 2,5-Diallyl-2,5-*exo*, *exo*-norbornandiol **30** nach **AVV 2**,
- 2.) enzymatische Aldoladdition nach **AVV 3** und
- 3.) enzymatische Dephosphorylierung nach **AVV 4**.

Ansatz :  
 1.) 1.04 g (5 mmol) **30**  
 2.) 2x2.5 mmol DHAP, 2x100 U FruA<sub>Sca</sub> (6d)  
 3.) 500 U Pase (3d)

Ausbeute :  
 400 mg (18%) von dem Gemisch **32A** und **32B** als gelber Sirup nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol : Wasser = 20:10:1)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):

$\delta = 4.07$  (ddd, 4-H),  $4.04$  (ddd, 4'-H),  $3.65$  (d, 1-H<sub>a</sub>),  $3.62$  (d, 1'-H<sub>a</sub>),  $3.51$  (d, 3'-H),  
 $3.49$  (d, 1-H<sub>b</sub>),  $3.48$  (d, 3-H),  $3.42$  (d, 1'-H<sub>b</sub>),  $3.00$  (d, 8(A)-H),  $2.68$  (dd, 7(B)-H<sub>a</sub>),  
 $2.65$  (d, 8(B)-H),  $2.58$  (d, 8'(B)-H),  $2.54$  (d, 8'(A)-H),  $2.52$  (dd, 7(A)-H<sub>a</sub>),  $2.36$  (dd, 5-H<sub>eq</sub>),  
 $2.29$  (dd, 5'-H<sub>eq</sub>),  $2.18$  (dd, 7(A)-H<sub>b</sub>),  $2.12$  (dd, 7(B)-H<sub>b</sub>),  $2.10$  (dd, 7(B)-H<sub>b</sub>),  
 $2.08$  (dd, 7(B)-H<sub>a</sub>),  $2.02$  (dd, 7'(A)-H<sub>b</sub>),  $1.92$  (m, 9(B)-H<sub>a</sub>),  $1.89$  (m, 2H, 9(A)-H),  
 $1.72$  (dd, 5-H<sub>ax</sub>),  $1.77$  (m, 9(B)-H<sub>b</sub>),  $1.75$  (dd, 5'-H<sub>ax</sub>),  $1.58$  (dd, 7'(A)-H<sub>a</sub>).  
 $J_{4-3} = 9.67$ ,  $J_{4-5eq} = 4.55$ ,  $J_{4-5ax} = 11.61$ ,  $J_{5ax-5eq} = 13.40$ ,  $J_{1a-1b} = 11.58$ ,  
 $J_{4'-3'} = 9.69$ ,  $J_{4'-5'eq} = 4.32$ ,  $J_{4'-5'ax} = 11.47$ ,  $J_{5'ax-5'eq} = 12.62$ ,  $J_{1'a-1'b} = 11.61$ ,  
 $J_{8(A)-7(A)b} = 3.50$ ,  $J_{8'(A)-7'(A)b} = 4.40$ ,  $J_{7(A)exo-7(A)endo} = 18.55$ ,  
 $J_{7'(A)exo-7'(A)endo} = 14.20$ ,  
 $J_{8(B)-7(B)b} = 2.50$ ,  $J_{8'(B)-7'(B)b} = 2.80$ ,  $J_{7'(B)exo-7'(B)endo} = 18.60$ ,  
 $J_{7(B)exo-7(B)endo} = 14.30$ ,  
 $J_{9(A)a-9(A)b} = 4.40$ ,  $J_{9(B)a-9(B)b} = 12.30$ .

 $^{13}\text{C}$ -NMR (125.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):



$\delta$  = 101.79 (C-2), 101.66 (C-2'), 83.35 (C-6), 82.44 (C-6'), 74.97 (C-3, C-3'), 69.10 (C-4), 67.95 (C-4'), 66.95 (C-1'), 66.75 (C-1), 54.27 (C-8(B)), 51.64 (C-8'(A)), 50.76 (C-8'(B)), 47.31 (C-8(A)), 46.62 (C-5'), 45.74 (C-5), 44.49 (C-7'(A)), 43.21 (C-7(A)), 41.61 (C-7(B)), 40.90 (C-7'(B)), 39.84 (C-9(A)), 36.98 (C-9(B)).

MS (SIMS, NBA; m/z (%)) :

410.9 (100)  $[M+H_2O]^-$ , 257.0 (62.3)  $[M-2(C_2H_4O_3)+OH]^-$ ,

167.0 (36.6)  $[M-2(C_3H_5O_5)+OH]^-$ .

$C_{17}H_{28}O_{10}$                       392.40

**(5-Desoxy-D-sorbose)-6-*spiro*-2'-norbornan-5'-*spiro*-6''-(5-desoxy-D-sorbose) 33A, 33B**

(5-Desoxy-D-xylo-hexulose-6-*spiro*-2'-norbornan-5'-*spiro*-6''-(5-desoxy-D-xylo-hexulose)

1.) Ozonolyse von 2,5-Diallyl-2,5-*exo*, *exo*-norbornandiol **30** nach **AVV 2**,

2.) enzymatische Aldoladdition nach **AVV 3** und

3.) enzymatische Dephosphorylierung nach **AVV 4**.

Ansatz :                      1.) 1.04 g (5 mmol) **30**

2.) 2x2.5 mmol DHAP, 2x100 U RhuA (6d)

3.) 500 U Pase (3d)

Ausbeute :                      400 mg (12%) von dem Gemisch **33A** und **33B** als gelber Sirup nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol : Wasser = 20:10:1)

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):

$\delta$  = 4.00 (td{ddd}, 4-, 4'-H), 3.62 (t{2xd}, 1-, 1'-H<sub>a</sub>), 3.46 (d, 1-H<sub>b</sub>), 3.43 (d, 1'-H<sub>b</sub>),

3.41 (d, 3-, 3'-H), 2.57 (d, 8-H), 2.34 (d, 8'-H), 2.21 (m, 5-H<sub>a</sub>), 2.16 (m, 5'-H<sub>a</sub>),

1.70-1.30 (m, 5-H<sub>b</sub>, 5'-H<sub>b</sub>, 7-, 7'-H<sub>a</sub>, 9-H<sub>a</sub>, 9-H<sub>b</sub>), 1.19 (m, 7-, 7'-H<sub>b</sub>).

$J_{4-3} = J_{4'-3'} = 10.5$ ,  $J_{4-5b} = J_{4'-5'b} = 13.0$ ,  $J_{4-5a} = J_{4'-5'a} = 3.6$ ,  $J_{1a-1b} = J_{1'a-1'b} = 11.5$ ,

$J_{5a-5b} = J_{5'a-5'b} = 13.4$ ,  $J_{7a-7b} = 13.7$ ,  $J_{7a-8} = 2.3$ ,  $J_{7'a-7'b} = 14.10$ ,  $J_{7'a-8'} = 4.3$ .

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 101.55 (C-2), 101.35 (C-2'), 83.95 (C-6), 82.73 (C-6'), 75.25 (C-3), 75.13 (C-3'), 69.19 (C-4), 68.05 (C-4'), 67.12 (C-1), 66.74 (C-1'), 47.18 (C-8'), 46.42 (C-5), 45.77 (C-5'), 44.68 (C-8'), 40.78 (C-9), 37.32 (C-7), 36.75 (C-7').

MS (SIMS, DTE/DTT/Sul;  $m/z$  (%)) :

413.8 (36.4)  $[\text{M}+3\text{Li}-\text{H}]^+$ , 398.1 (34.3)  $[\text{M}+\text{Li}-\text{H}]^+$ , 149.2 (100)  $[\text{M}-2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_5)-\text{H}]^+$ .

$\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$                       392.40

### 3,7-Diallylbicyclo[3.3.0]octan-3,7-diol **35**

### 3-Allyl-3-Hydroxybicyclo[3.3.0]octan-7-on **36**

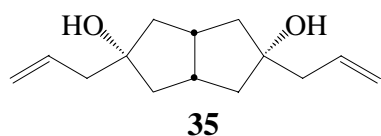
Allylierung von Bicyclo[3.3.0]octan-3,7-dion mit Allylbromid / Zink nach **AVV 1**.

Ansatz :                      2 g (14.5 mmol) Bicyclo[3.3.0]octan-3,7-dion **34**

Ausbeute :                      nach Trennung durch Chromatographie auf Kieselgel (Cyclohexan : Essigsester = 5:1)

2.03 g (63%) 3,7-Diallylbicyclo[3.3.0]octan-3,7-diol **35** als farblose Kristalle

0.97 g (37%) 3-Allyl-3-Hydroxybicyclo[3.3.0]octan-7-on **36** als farblose Kristalle



$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 5.98-5.81 (ddt, 2-, 2'-H), 5.12 (d, 1-, 1'-H<sub>cis</sub>), 5.10 (d, 1-, 1'-H<sub>trans</sub>), 2.99 (s, OH), 2.70-2.56 (ddd, 7-, 7'-H), 2.28 (d, 3-, 3'-H), 1.90 (d, 6-, 6'-H<sub>a</sub>), 1.95 (d, 5-, 5'-H<sub>a</sub>), 1.80-(d, 5-, 5'-H<sub>b</sub>), 1.80 (d, 6-, 6'-H<sub>b</sub>).

$J_{1cis-1trans} = J_{gem} = 2.35$ ,  $J_{1cis-2} = 10.58$ ,  $J_{1trans-2} = 16.62$ ,  $J_{2-3} = 7.38$ ,

$J_{5a-5b} = J_{6a-6b} = 13.77$ ,  $J_{5a-7} = J_{6a-7'} = 9.37$ ,  $J_{5b-7} = J_{6b-7'} = 3.70$ ,  $J_{7-7'} = 4.20$ .

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 134.61 (C-2, C-2'), 118.31 (C-1, C-1'), 83.50 (C-4, C-4'), 46.61 (C-5, C-5', C-6, C-6'), 45.73 (C-3, C-3'), 41.92 (C-7, C-7').

MS (EI;  $m/z$  (%)) :

163.1 (100)  $[\text{M}-2(\text{CHOH})+\text{H}]^+$ , 135.1  $[\text{M}-2(\text{C}_2\text{H}_3\text{OH})+\text{H}]^+$ ,

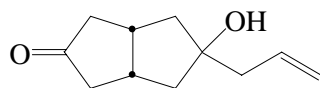
121.1  $[\text{M}-\text{CH}_2-2(\text{C}_2\text{H}_3\text{OH})+\text{H}]^+$ , 105.1  $[\text{M}-2(\text{C}_3\text{H}_6\text{OH})+\text{H}]^+$

$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$  : 222.33

ber. C 75.63 H 9.97

gef. C 75.00 H 9.93

3-Allyl-3-Hydroxybicyclo[3.3.0]octan-7-on **36**



**36**

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 5.96-5.79 (ddt, 2-H), 5.42 (bs, OH), 5.12 (d, 1- $\text{H}_{\text{cis}}$ ), 5.10 (d, 1- $\text{H}_{\text{trans}}$ ), 3.09 (m, 7-H), 2.73 (m, 8-H), 2.62 (dd, 5-, 6- $\text{H}_a$ ), 2.40 (d, 2-H), 2.19 (dd, 5-, 6- $\text{H}_b$ ), 2.03 (dd, 9-, 10- $\text{H}_a$ ), 1.92 (d, 9-, 10- $\text{H}_b$ ).

$J_{1\text{cis}-2} = 11.42$ ,  $J_{1\text{trans}-2} = 15.78$ ,  $J_{2-3} = 7.38$ ,  $J_{5a-5b} = J_{6a-6b} = 19.47$ ,

$J_{5a-7} = J_{6a-8} = 8.72$ ,  $J_{5b-7} = J_{6b-8} = 5.03$ ,  $J_{9a-9b} = J_{10a-10b} = 14.10$ ,  $J_{9a-7} = J_{10a-8} = 9.20$ .

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 219.45 (C-11), 134.0 (C-2), 118.67 (C-1), 86.40 (C-4), 46.21 (C-9, C-10), 45.25 (C-3), 43.77 (C-5, C-6), 42.47 (C-7), 36.43 (C-8).

$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$

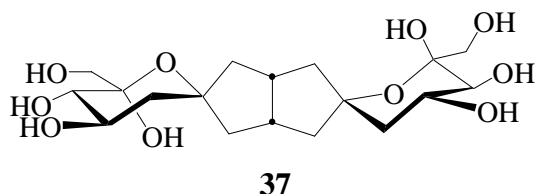
180.25

**(5-Desoxy-D-fructose)-6-*spiro*-3'-bicyclo[3.3.0]octan-7'-*spiro*-6''-(5-desoxy-D-fructose) 37**  
 (5-Desoxy-D-*arabino*-hexulose)-6-*spiro*-3'-bicyclo[3.3.0]octan-7'-*spiro*-6''-(5-desoxy-D-*arabino*-hexulose)

- 1.) Ozonolyse von 3,7-Diallylbicyclo[3.3.0]octan-3,7-diol **35** nach **AVV 2**,
- 2.) enzymatische Aldoladdition nach **AVV 3** und
- 3.) enzymatische Dephosphorylierung nach **AVV 4**.

Ansatz :                    1.) 550 mg (2.5 mmol) **35**  
                               2.) 2x1.25 mmol DHAP, 2x100 U FruA<sub>sca</sub> (6d)  
                               3.) 250 U Pase (3d)

Ausbeute :                100 mg (10%) von **37** als gelber Sirup nach Chromatographie an  
 Kieselgel (Chloroform : Methanol : Wasser = 50:10:1)



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ = 4.04 (ddd, 4-, 4'-H), 3.60 (d, 1-, 1'-H<sub>a</sub>), 3.48 (d, 3-, 3'-H), 3.36 (d, 1-, 1'-H<sub>b</sub>),  
 2.95-2.75 (m, 9-, 9'-H), 2.62 (m, 7-, 7'-H<sub>a</sub>), 2.30 (d, 7-, 7'-H<sub>b</sub>), 2.15 (dd, 5-, 5'-H<sub>a</sub>),  
 2.01 (m, 8-, 8'-H<sub>a</sub>), 1.75 (m, 8-, 8'-H<sub>b</sub>), 1.68 (t, 5-, 5'-H<sub>b</sub>).

J<sub>4-3</sub> = 9.74, J<sub>4-5b</sub> = 11.75, J<sub>4-5a</sub> = 4.37, J<sub>1a-1b</sub> = 11.42, J<sub>5a-5b</sub> = 12.70.

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ = 101.54 (C-6,-6'), 87.69 (C-2,-2'), 75.99 (C-3,-3'), 69.00 (C-4,-4'), 66.78 (C-1,-1'),  
 47.77 (C-8,-8'), 46.82 (C-7, -7'), 44.36 (C-5,-5'), 38.12 (C-9,-9').

MS (SIMS, DTE/DTT/Sul; m/z (%)) :

413.2 (61.5) [M+Li]<sup>+</sup>, 397.2 (76.3) [M+Li-O]<sup>+</sup>, 149.0 (100) [C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>]<sup>+</sup>

C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>10</sub>                406.43

**(5-Desoxy-D-sorbose)-6-*spiro*-3'-bicyclo[3.3.0]octan-7'-*spiro*-6''-(5-desoxy-D-sorbose) 38**  
 (5-Desoxy-D-xylo-hexulose)-6-*spiro*-3'-bicyclo[3.3.0]octan-7'-*spiro*-6''-(5-desoxy-D-xylo-hexulose)

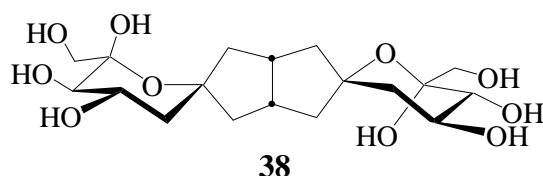
1.) Ozonolyse von 3,7-Diallylbicyclo[3.3.0]octan-3,7-diol **35** nach **AVV 2**,

2.) enzymatische Aldoladdition nach **AVV 3** und

3.) enzymatische Dephosphorylierung nach **AVV 4**.

Ansatz :                    1.) 550 mg (2.5 mmol) **35**  
                               2.) 2x1.25 mmol DHAP, 2x100 U RhuA (6d)  
                               3.) 250 U Pase (3d)

Ausbeute :                100 mg (8%) von **38** als gelber Sirup nach Chromatographie an  
                                   Kieselgel (Chloroform : Methanol : Wasser = 50:10:1)



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):

$\delta$  = 4.05 (ddd, 4-, 4'-H), 3.60 (d, 1-, 1'-H<sub>a</sub>), 3.47 (d, 3-, 3'-H), 3.35 (d, 1-, 1'-H<sub>b</sub>),  
 2.96-2.75 (m, 9-, 9'-H), 2.60-2.70 (m, 7-, 7'-H<sub>a</sub>), 2.35 (d, 7-H<sub>b</sub>), 2.30 (d, 7'-H<sub>b</sub>),  
 2.10 (dd, 5-, 5'-H<sub>a</sub>), 2.01 (m, 8-, 8'-H<sub>a</sub>), 1.78 (m, 8-, 8'-H<sub>b</sub>), 1.68 (t, 5-, 5'-H<sub>b</sub>).  
 $J_{4-3} = 9.62$ ,  $J_{4-5b} = 11.83$ ,  $J_{4-5a} = 4.52$ ,  $J_{1a-1b} = 11.48$ ,  $J_{5a-5b} = 12.80$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):

$\delta$  = 101.80 (C-6,-6'), 87.63 (C-2,-2'), 75.22 (C-3,-3'), 69.95 (C-4,-4'), 66.85 (C-1,-1'),  
 50.91 (C-8,-8'), 47.74 (C-7, -7'), 44.36 (C-5,-5'), 38.18 (C-9,-9').

MS (ESI; m/z (%)) :

413.4 (28)  $[\text{M}+\text{Li}]^+$ , 369.2 (100)  $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^+$ , 295.2 (80)  $[\text{M}-(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2+\text{Li}]^+$

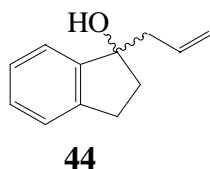
$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$                 406.43

**1-Allylindan-1-ol 44**

Allylierung von 1-Indanon **43** mit Allylbromid / Zink nach **AVV 1**.

Ansatz : 5 g (4.54 mmol) 1-Indanon **43**

Ausbeute : 5.80 g (88%) **44** als gelber Sirup nach Chromatographie an Kieselgel  
(Cyclohexan : Essigester = 10:1)



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 7.32-7.25 (m, 11-H arom.), 7.25-7.10 (m, 3H arom.), 5.80 (ddd, 2-H), 5.12 (d, 1<sub>a</sub>-H),  
5.10 (d, 1<sub>b</sub>-H), 2.94 (ddd, 5<sub>a</sub>-H), 2.75 (dd, 5<sub>b</sub>-H), 2.59 (dd, 6<sub>a</sub>-H), 2.46 (dd, 6<sub>b</sub>-H),  
2.30 (ddd, 3<sub>a</sub>-H), 2.16(s, OH), 2.05 (ddd, 3<sub>b</sub>-H).

$J_{1a-2} = J_{trans} = 16.86$ ,  $J_{1b-2} = J_{cis} = 10.34$ ,  $J_{2-3a} = 8.25$ ,  $J_{2-3b} = 8.61$ ,  $J_{3a-3b} = 13.02$ ,  
 $J_{3a-5a} = 4.70$ ,  $J_{5a-5b} = 16.06$ ,  $J_{6a-6b} = 13.73$ ,  $J_{5a-6a} = 7.61$ ,  $J_{5b-6b} = 4.64$ ,  $J_{5a-6b} = 1.18$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 147.04, 142.98 (C-7, C-12), 134.06 (C-2), 128.47, 126.87, 125.13,  
123.15 (C-8, C-9, C-10, C-11), 118.91 (C-1), 82.78 (C-4), 45.26 (C-6), 39.84 (C-3),  
29.65 (C-5).

MS (EI;  $m/z$  (%)):

156 (6)  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , 133 (100)  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_5]^+$ , 105 (31)  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_5\text{O}]^+$ .

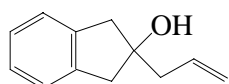
$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}$  174.24

**2-Allylindan-2-ol 46**

Allylierung von 2-Indanon **45** mit Allylbromid / Zink nach **AVV 1**.

Ansatz : 5 g (4.54 mmol) **45**

Ausbeute : 5.80 g (84%) **46** als gelber Sirup nach Chromatographie an Kieselgel  
(Cyclohexan : Essigester = 3:1)

**46**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 7.20-7.05 (m, 4H arom.), 5.90 (m, 2-H), 5.14 (d, 1<sub>a</sub>-H), 5.10 (d, 1<sub>b</sub>-H),

2.98 (d, 5<sub>a</sub>-, 6<sub>a</sub>-H), 2.85 (d, 5<sub>b</sub>-, 6<sub>b</sub>-H), 2.54 (s, OH), 2.42 (d, 3-H).

$J_{5a-5b} = J_{6a-6b} = 16.27$ ,  $J_{2-3} = 7.32$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 141.38 (C-7, C-12), 134.22 (C-2), 126.80, 125.41 (C-8, C-9, C-10, C-11), 119.07 (C-1),

82.18 (C-4), 46.67 (C-5, C-6), 45.15 (C-3).

MS (EI;  $m/z$  (%)):

174 (7)  $[\text{M}]^+$ , 133 (100)  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_5]^+$ , 115 (14)  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7\text{O}]^+$ , 105 (74)  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_5\text{O}]^+$ .

$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}$  174.24

**(5-Desoxy-D-fructose)-2-indan 47**

(5-Desoxy-D-*arabino*-hexulose)-2-indan

1.) Ozonolyse von **46** nach **AVV 2**,

2.) enzymatische Aldoladdition nach **AVV 3** und

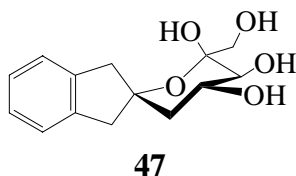
3.) enzymatische Dephosphorylierung nach **AVV 4**.

Ansatz : 1.) 435.6 mg (2.5 mmol) **46**

2.) 2x1.25 mmol DHAP, 2x100 U Fru<sub>Arab</sub>(6d)

## 3.) 250 U Pase (3d)

Ausbeute : 100 mg (10%) von **47** als gelber Sirup nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol : Wasser = 50:10:1)



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):

$\delta$  = 7.20-7.04 (m, 4H<sub>arom.</sub>), 4.09 (ddd, 4-H), 3.61 (d, 1-H<sub>a</sub>), 3.48 (d, 3-H), 3.43 (d, 7-H<sub>a</sub>), 3.40 (d, 1H<sub>b</sub>), 3.21 (d, 8-H<sub>a</sub>), 3.15 (d, 7-H<sub>b</sub>), 2.89 (d, 8-H<sub>b</sub>), 2.10 (dd, 5-H<sub>a</sub>), 1.62 (t, 5-H<sub>b</sub>).  
 $J_{4-3} = 9.92$ ,  $J_{4-5b} = 7.35$ ,  $J_{4-5a} = 4.33$ ,  $J_{1a-1b} = 10.91$ ,  $J_{5a-5b} = 12.80$ ,  $J_{7a-7b} = 15.80$ ,  
 $J_{8a-8b} = 15.70$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):

$\delta$  = 142.98, 141.03 (C-9,-10), 127.25, 127.20, 125.43, 124.97 (C-11,-12, -13, -14),  
 100.08 (C-2), 84.89 (C-6), 74.44 (C-3), 67.38 (C-4), 66.13 (C-1), 49.37 (C-8),  
 45.72 (C-7), 43.58 (C-5).

MS (EI; m/z (%)) :

288.8 (100)  $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}]^+$ , 228.9 (37)  $[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2]^+$ , 210.9 (17)  $[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_2\text{H}_7\text{O}_3]^+$ ,  
 129.0 (8)  $[\text{C}_{10}\text{H}_9]^+$ , 94.9 (25)  $[\text{C}_7\text{H}_{10}]^+$ .

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_5$                       266.29

### Synthese von Indenol **50** via Cooxidation

8.2 g (57 mmol) Chlorthiophenyl wird in 50-100 ml Hexan (oder Cyclohexan) und 6.4 ml (55 mmol) Inden gelöst. Das Gemisch wird bei RT unter einer Luftzufuhr 7 Tage gerührt. Nachdem die Mischung mit einer Lösung von  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gewaschen wird, wird ein Gemisch von 2-*p*-Chlorphenylsulfinyl-1-indanol und von *p*-Chlorphenylmercapto-2-indan (1:2 laut  $^1\text{H-NMR}$ ) mit Essigester in einer Ausbeute von 40% extrahiert.



Nach einer chromatographischen Aufreinigung wird 5g (17 mmol) 2-*p*-Chlorphenylsulfinyl-1-indanol mit 5g Natriumacetat in 50 ml Acetanhydrid und in Toluol unter Rückfluß über Nacht versetzt. Nach Extraktion mit Essigester und einer chromatographischen Trennung von dem Nebenprodukt, dem Dithiol wird das erhaltene Acetat **51** (3 g, 17 mmol) mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in Methanol zum Indenol **50** hydrolysiert.

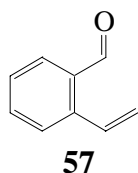
Aubeute : 40-50% Indenol **50**  
nach Flash-Chromatographie an deaktiviertem Kieselgel  
(Cyclohexan : Essigester = 5:1)

### 2-Ethenylbenzaldehyd **57**

N-Formylierung von Bromstyrol mit N-Formylpiperidin

Ansatz : 2 ml (15.36 mmol) Bromstyrol  
Ausbeute : 2 g (98%, rohes Produkt) **57** als gelbe Flüssigkeit

Zu einer Lösung von 2 ml (15.36 mmol) Bromstyrol in 12 ml abs. Tetrahydrofuran wird 9.7 ml (1 Äq.) *n*-Butyllithium (1.6 M in Hexan) unter Stickstoff und bei -78°C langsam zugegeben. Man lässt 30 Minuten bei -78°C rühren und auf -65°C erwärmen. Dann wird 1.87 ml (1.08 Äq.) N-Formylpiperidin zugetropft. Man lässt das Gemisch über Nacht langsam auf Raumtemperatur erwärmen. Man quencht durch Zugabe von einer gesättigten Ammoniumchloridlösung, verdünnt mit Ether, wäscht mit einer 2N-Salzsäure-, einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-, und einer Natriumchloridlösung, und engt vollständig ein. Das Produkt ist instabil auf Kieselgel (Reduktion zum Alkohol) und wird ohne weitere Reinigung weitereingesetzt.



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ = 7.82 (d, 1-H), 7.65-7.40 (m, 4H, arom. H), 7.35-7.10 (m, 4-H), 5.7 (dd, 5-H<sub>trans</sub>), 5.52 (dd, 5-H<sub>cis</sub>).

J<sub>5cis-4</sub>=10.98, J<sub>5trans-4</sub>=17.36, J<sub>5cis-5trans</sub>=1.05.

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 192.54 (C=O), 140.62, 132.97 (C-2, C-3), 133.92, 133.47 (arom. C), 131.34 (C-4), 128.15, 127.77 (arom. C), 119.54 (C-5).

MS (EI; m/z (%)):

132 (100)  $[\text{M}]^+$ , 104 (72.8)  $[\text{M}-(\text{C}_2\text{H}_4)]^+$ , 77 (45.5)  $[\text{M}-(\text{C}_3\text{H}_2\text{OH})]^+$ ,

51 (39.0)  $[\text{M}-(\text{C}_5\text{H}_4\text{OH})]^+$ .

$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}$                       132.16

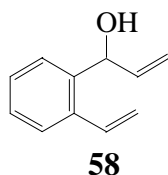
### 1-(2-Vinylphenyl)prop-2-en-1-ol **58**

Vinylierung von **57** mit Vinylmagnesiumbromid.

Ansatz :                      500 mg (3.8 mmol) **57**

Ausbeute :                      364 mg (60%) **58** als gelbe Flüssigkeit nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 3:1)

Zu einer Lösung von 500 mg (3.8 mmol) **57** in 4 ml abs. Tetrahydrofuran wird 6.7 ml (1.7 Äq.) von einer 1 M Vinylmagnesiumbromidlösung in THF unter Stickstoff und bei Raumtemperatur langsam zugegeben. Der Verlauf der Reaktion wird durch DC (Cyclohexan : Essigester = 2:1) verfolgt. Der Überschuß von Vinylmagnesiumbromid wird mit einer gesättigten Ammoniumchloridlösung hydrolysiert. Man läßt das Gemisch bei Raumtemperatur ungefähr eine Stunde rühren. Das gewünschte Produkt wird mit Ether extrahiert und nach Trocknen säulenchromatographisch gereinigt.



$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 7.50-7.40 (m, 2H, arom. H), 7.35-7.20 (m, 2H, arom. H), 7.07 (dd, 10-H), 6.05 (ddd, 2-H), 5.62 (dd, 11- $\text{H}_{\text{trans}}$ ), 5.47 (d, 3-H), 5.35 (dd, 11- $\text{H}_{\text{cis}}$ ), 5.29 (dt, 1- $\text{H}_{\text{trans}}$ ), 5.19 (dt, 1- $\text{H}_{\text{cis}}$ ), 2.10 (bs, OH).

$J_{1\text{cis}-2}=10.45$ ,  $J_{1\text{trans}-2}=17.24$ ,  $J_{1\text{cis}-1\text{trans}}=1.45$ ,  $J_{2-3}=5.31$ ,  $J_{11\text{cis}-10}=10.94$ ,  
 $J_{11\text{trans}-10}=17.34$ ,  $J_{11\text{cis}-11\text{trans}}=1.44$ .

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 139.73 (C-2), 139.60, 136.51 (C-4, C-9), 134.49 (C-10), 128.26, 128.10, 126.56 (4 C, arom. C), 116.80 (C-11), 115.41 (C-1), 72.05 (C-3).

MS (FD;  $m/z$  (%)) :

160 (17.5)  $[\text{M}]^+$ , 142 (62.5)  $[\text{M}-\text{OH}]^+$ , 129 (100)  $[\text{M}-\text{CH}_2\text{OH}]^+$ , 115 (61.7)  $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}]^+$ ,  
105 (43.4)  $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_2\text{OH}]^+$ , 91 (56.7)  $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_4\text{OH}]^+$ .

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}$                       160.22

### 1-Indenol **50**

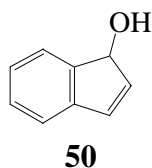
RCM-Reaktion mit **58**

Ansatz :                      100 mg (0.62 mmol) **58**

20 mg (4 Mol.%) Grubb's Katalysator **54**

Ausbeute :                      45 mg (60%) **50** als gelbe Flüssigkeit nach Chromatographie an  
Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 3:1)

Zu einer Lösung von 100 mg (0.62 mmol) **58** in 6 ml abs. Toluol wird 1.1 ml (4 Mol.%) Grubb's Katalysatorlösung (20 mg in 1 ml Toluol) unter Stickstoff und bei 40°C langsam zugegeben. Man läßt ungefähr 4 Stunden rühren. Der Verlauf der Reaktion wird durch DC (Cyclohexan : Essigester = 3:1) verfolgt.



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 7.47 (d, 5-H), 7.27-7.12 (m, 3H, arom. H), 6.70 (d, 3-H), 6.36 (dd, 2-H), 5.13 (s, 1-H), 1.9 (bs, OH).  
 $J_{1-2}=1.9$ ,  $J_{2-3}=5.62$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 146.13, 142.96 (C-4, C-9), 138.36 (C-2), 133.27 (C-3), 129.10, 126.73 (2 arom.C), 124.04 (arom. C-5), 122.02 (arom. C), 78.15 (C-1).

MS (EI; m/z (%)):

132 (100)  $[\text{M}]^+$ , 115 (15.6)  $[\text{M-OH}]^+$ , 103 (29.9)  $[\text{M-(COH)}]^+$ , 77 (27.8)  $[\text{M-(C}_3\text{H}_2\text{OH)}]^+$ , 51 (16.9)  $[\text{M-(C}_5\text{H}_4\text{OH)}]^+$ .

$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}$             132.16

### 1-(2-Vinyl-phenyl)-but-3-en-1-ol **62**

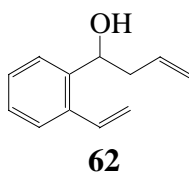
Allylierung von **57** nach Barbier.

Ansatz :                    1 g (7.56 mmol) **57**

Ausbeute :                400 mg (40%) **62** als gelbe Flüssigkeit nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 3:1)

1 g (7.56 mmol) des Aldehyds **57** wird mit 1 Volumenteil (5 ml) THF und 4 Volumenteilen (20 ml) gesättigter wässriger  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung versetzt. Es werden 1 Äquivalente (0.5 g) Zink-Staub zugegeben und unter heftigem Rühren 1 Äquivalente (0.6 ml) Allylbromid langsam zugetropft, so dass die Temperatur der Mischung nicht  $50^\circ\text{C}$  überschreitet. Es wird ungefähr 3 Stunden bei RT rühren lassen. Bei unvollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wird länger gerührt und zusätzlich 1 Äquivalent Allylbromid zugegeben.

Der anorganische Niederschlag wird abgesaugt und gründlich mit Essigester gewaschen. Die vereinigten flüssigen Phasen werden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit dem dreifachen Volumen Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt.



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 7.48-7.40 (m, 2H, arom. H), 7.29-7.19 (m, 2H, arom. H), 6.98 (dd, 11-H), 5.78 (m, 2-H<sub>2</sub>), 5.59 (dd, 12-H<sub>trans</sub>), 5.29 (dd, 11-H<sub>cis</sub>), 5.12 (m, 1-H<sub>trans</sub>, 1-H<sub>cis</sub>), 4.99 (dd, 4-H), 2.43 (m, 3-H<sub>2</sub>), 2.30 (bs, OH).

$J_{12\text{cis-11}}=10.95$ ,  $J_{12\text{trans-11}}=17.30$ ,  $J_{12\text{cis-12trans}}=1.44$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 141.05, 135.64 (C-5, C-10 quat.), 134.77 (C-11, =CH), 134.24 (C-2, =CH), 128.11, 127.61, 126.31, 125.57 (4C, arom. C), 118.36 (C-12, =CH<sub>2</sub>), 116.70 (C-1, =CH<sub>2</sub>), 68.81 (C-4, C-OH), 43.00 (C-3, CH<sub>2</sub>).

$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}$       174.24

### 1-Hydroxy-1,2-dihydronaphthalin **59**

RCM-Reaktion mit **62**.

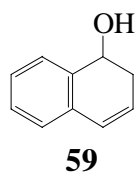
Ansatz :                      100 mg (0.57 mmol) **62**

20 mg (4 Mol.%) Grubb's Katalysator **54**

Ausbeute :                      40 mg (60%) **59** als gelbe Flüssigkeit nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 3:1)

Zu einer Lösung von 100 mg (0.57 mmol) **69** in 6 ml abs. Toluol wird 1.1 ml (4 Mol.%) Grubb's Katalysatorlösung (20 mg in 1 ml Toluol) unter Stickstoff und bei Raumtemperatur

langsam zugegeben. Man läßt ungefähr 4 Stunden rühren. Der Verlauf der Reaktion wird durch DC (Cyclohexan : Essigester = 3:1) verfolgt.



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 7.28 (dd, 6-H), 7.24-7.13 (m, 2H, arom. H), 7.05 (dd, 9-H), 6.47 (dt, 4-H), 5.90 (dt, 3-H), 4.69 (t, 1-H), 2.52 (ddd, 2-H), 1.69 (bs, OH).

$J_{1-2}=5.43$ ,  $J_{2-3}=4.19$ ,  $J_{3-4}=9.61$ ,  $J_{4-2}=1.71$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 136.41, 132.89 (C-5, C-10), 127.71, 127.30, 127.11 (3 arom.C), 126.72 (C-4), 125.93 (arom. C-6), 125.58 (C-3), 67.79 (C-1).

MS (FI; m/z (%)):

146 (100)  $[\text{M}]^+$ , 129 (9.0)  $[\text{M-OH}]^+$ .

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}$       146.19

### 1-(2-Pent-4-enyl-phenyl)-but-3-en-1-ol **63**

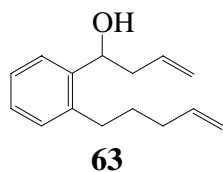
Zweifache Allylierung mit **57**.

Ansatz :                      540 mg (4 mmol) **57**

Ausbeute :                      220 mg (25%) **63** als gelbe Flüssigkeit nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 5:1)

Zu einer Lösung von 540 mg (4 mmol) **57** in 4 ml abs. Tetrahydrofuran wird 8 ml (2 Äq.) von einer 1 M Allylmagnesiumbromidlösung in Ether unter Stickstoff und bei Raumtemperatur langsam zugegeben. Der Verlauf der Reaktion wird durch DC (Cyclohexan : Essigester = 2:1) verfolgt. Der Überschuß von Allylmagnesiumbromid wird nach 3 Stunden mit einer gesättigten Ammoniumchloridlösung hydrolysiert. Man läßt das Gemisch bei

Raumtemperatur ungefähr eine Stunde rühren. Das gewünschte Produkt wird mit Ether extrahiert und nach Trocknen säulenchromatographisch gereinigt.



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 7.45 (m, 6-H, arom. H), 7.24-7.11 (m, 3H, arom. H), 6.98 (dd, 11-H), 5.83 (m, 2-H, 14-H), 5.09 (m, 15- $\text{H}_{\text{trans}}$ , 15- $\text{H}_{\text{cis}}$ ), 5.00 (m, 1- $\text{H}_{\text{trans}}$ , 1- $\text{H}_{\text{cis}}$ ), 2.61 (td, 11- $\text{H}_2$ ), 2.45 (tt, 3- $\text{H}_2$ ), 2.12 (m, OH, 13- $\text{H}_2$ ), 1.67 (m, 12- $\text{H}_2$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 141.49, 138.93 (C-5, C-10 quat.), 138.32 (C-14, =CH), 134.86 (C-2, =CH), 129.35, 127.35, 126.33, 125.64 (4C, arom. C), 117.99 (C-15, = $\text{CH}_2$ ), 114.96 (C-1, = $\text{CH}_2$ ), 69.27 (C-4, C-OH), 43.35 (C-3,  $\text{CH}_2$ ), 33.59, 31.70, 30.70 (3 C,  $\text{CH}_2$ ).

$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}$       216.32

#### ***cis*-4-Cyclohexene-1,2-diol *cis*-66**

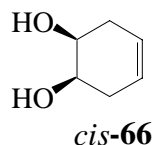
RCM-Reaktion mit *meso*-Octa-1,7-diene-4,5-diol *meso*-65.

Ansatz :                      250 mg (1.75 mmol) *meso*-65

25 mg (5 Mol.%) Grubb's Katalysator 54

Ausbeute :                      80 mg (70%) Cyclohex-4-ene-1,2-diol als gelbe Flüssigkeit nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 2:1)

Zu einer Lösung von 250 mg (1,75 mmol) *meso*-65 in 6 ml abs. Toluol wird 1.1 ml (5 Mol.%) Grubb's Katalysatorlösung (25 mg in 1 ml Toluol) unter Rückfluß und unter Stickstoff langsam zugegeben. Man lässt ungefähr 4 Stunden rühren. Der Verlauf der Reaktion wird durch DC (Cyclohexan : Essigester = 2:1) verfolgt.



$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 5.51$  (s, 3-, 3'-H),  $3.87$  (s, 1-, 1'-H),  $2.30$  (d, 2-, 2'-H<sub>a</sub>),  $2.30$  (d, 2-, 2'-H<sub>b</sub>).

$J_{2a-2b} = J_{2a-2b} = 16.72$  Hz.

$^{13}\text{C}$ -NMR (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 123.82$  (C-3, C-3'),  $69.00$  (C-1, C-1'),  $31.08$  (C-2, C-2').

MS (EI;  $m/z$  (%)):

$114$  (100)  $[\text{M}]^+$ ,  $96$  (8.9)  $[\text{M}-\text{OH}]^+$ .

$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2$       114.14

### Bicyclo[4.4.0]dec-3-ene-1,6-diol **68**

RCM-Reaktion mit 1,2-Diallyl-1,2-cyclohexandiol **67**.

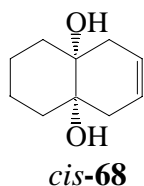
Ansatz :                      100 mg (0.50 mmol) **67**

20 mg (4 Mol.%) Grubb's Katalysator **54**

Ausbeute :                      50 mg (60%) **68** als gelbe Flüssigkeit nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan : Essigester = 3:1)

Zu einer Lösung von 100 mg (0.50 mmol) **67** in 6 ml abs. Toluol wird 1.1 ml (4 Mol.%) Grubb's Katalysatorlösung (20 mg in 1 ml Toluol) unter Rückfluß und unter Stickstoff langsam zugegeben. Man lässt ungefähr 4 Stunden rühren. Der Verlauf der Reaktion wird durch DC (Cyclohexan : Essigester = 3:1) verfolgt.





$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 5.57 (t, 1-, 1'-H), 2.33 (d, 2-, 2'-H<sub>a</sub>), 2.23 (d, 2-, 2'-H<sub>b</sub>), 2.07 (bs, OH),

1.8-1.59 (m, 4-, 4'-, 5-, 5'-H<sub>a</sub>), 1.59-1.20 (m, 4-, 4'-, 5-, 5'-H<sub>b</sub>).

$J_{1-1'} = 1.44$ ,  $J_{2a-2b} = J_{2'a-2'b} = 16.95$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  = 123.85 (C-1, -1'), 72.29 (C-3, -3'), 36.73 (C-2, -2'), 34.11 (C-4, -4'), 22.05 (C-5, -5').

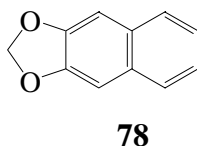
MS (FD;  $m/z$  (%)) :

168 (100)  $[\text{M}]^+$ , 151 (0.007)  $[\text{M-OH}]^+$ .

$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$                       168.24

### Naphthalin-2,3-dioxolane **78**

Zu 3.8g (5eq) Caesiumfluorid CsF wird eine Lösung des 5mmol (0.8g) 2,3-Hydroxynaphtalin in 16ml trockenem DMF unter Rührung zugetropft. Die Mischung wird erwärmt. Zu der gekühlten Mischung wird 0.386ml (1.1eq) Methylenbromid  $\text{CH}_2\text{Br}_2$  zugetropft. Das Gemisch wird 2 h bei 120-130°C erhitzt. Die abgekühlte Mischung wird dann filtriert, mit Essigester extrahiert und mit Wasser und 2M-Natronlauge gewaschen. Die organische Phase wird nach Trocknen mit Magnesiumsulfat und Konzentration mit Cyclohexan/Essigester 10:1 über Kieselgel chromatographiert. Man erhält 630 mg (75%) **78** als einen weißen Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 5.99 (s,  $\text{CH}_2$ ), 7.09 (s, 2H, H-1, H-4), 7.30 (dd,  $^4J=3.35$ ,  $^3J=6.04$ , 2H, H-6, H-9), 7.63 (dd,  $^4J=3.35$ ,  $^3J=6.04$ , 2H, H-7, H-8)

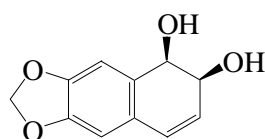
$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :

$\delta$  = 100.94 ( $\text{CH}_2$ ), 103.86 (C-1, C-4), 124.34 (C-6, C-9), 126.99 (C-7, C-8), 130.47, 147.55 (quat. Aromat-C)

$\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_2$ : 172.08	ber. C 76.73	H 4.68
	gef. C 76.46	H 4.59

### 5,6-Dihydronaphthalin-1,3-dioxol-5,6-*cis*-diol **79**

Das *cis*-Diol **79** wird durch eine *cis*-Dihydroxylierung mit einer Naphthalindioxygenase aus *Pseudomonas putida* G7 in einer Ausbeute von 85% in enantiomerenreiner Form (> 98% *ee*) erhalten.



**79**

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):

$\delta$  = 5.66, 5.31 (2s, H-6, H-10), 5.08 (dd, H-3), 4.66 (s, 2H, H-8), 4.59 (dd, H-4), 3.19 (d, H-1), 2.97 (dt, H-2).

$J_{3-4} = 9.68$ ,  $J_{2-4} = 3.98$ ,  $J_{2-3} = 0.78$ ,  $J_{1-2} = 4.86$  Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):

$\delta$  = 147.23, 147.10 (C-7, -9), 130.42 (C-11), 128.10, 126.91 (C-6, -10), 126.54 (C-5), 107.97, 107.02 (C-3, -4), 101.04 (C-8), 70.59, 67.75 (C-1, -2).

MS (ESI;  $m/z$  (%)): 206(17)  $[\text{M}]^+$ , 188 (100)  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$

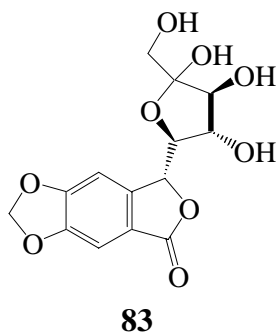
C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>      206.06

### FruA-Addukt **83**

- 1.) Ozonolyse von **79** nach **AVV 2**,
- 2.) enzymatische Aldoladdition nach **AVV 3** und
- 3.) enzymatische Dephosphorylierung nach **AVV 4**.

Ansatz :            1.) 295 mg (1.4 mmol) **79**  
                       2.) 2x0.7 mmol DHAP, 2x150 U FruA<sub>Arab</sub> (4d)  
                       3.) 200 U Pase (3d)

Ausbeute :        50 mg (10%) **83** als farbloser Feststoff nach Chromatographie  
                           an Kieselgel (Chloroform : Methanol : Wasser = 50:10:1)



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ = 7.16, 7.12 (2x s, 2H arom.), 6.17 (s, 10-H<sub>2</sub>), 5.60 (d, 6-H), 4.25 (t, 4-H), 4.13 (d, 3-H),  
 4.00 (dd, 5-H), 3.65 (d, 1a-H), 3.60 (d, 1b-H).

J<sub>5-6</sub> = 5.75, J<sub>5-4</sub> = 6.84, J<sub>4-3</sub> = 7.88, J<sub>1a-1b</sub> = 12.14 Hz.

<sup>13</sup>C-NMR (75.4 MHz, D<sub>2</sub>O):

δ = 175.59 (C-14), 157.00, 152.39 (C-9, -11), 147.07 (C-13), 121.18 (C-7), 106.50, 106.24  
 (C-8, C-12), 106.09 (C-10), 104.94 (C-2), 83.67 (C-6), 83.42 (C-5), 78.31 (C-3), 77.70 (C-4),  
 65.47 (C-1).

MS (ESI; m/z (%)): 349 (100) [M+Na]<sup>+</sup>

C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>9</sub>            326.26

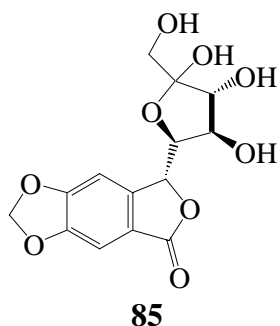
**RhuA-Addukte 85 und 86**

- 1.) Ozonolyse von **79** nach **AVV 2**,
- 2.) enzymatische Aldoladdition nach **AVV 3** und
- 3.) enzymatische Dephosphorylierung nach **AVV 4**.

Ansatz :            1.) 240 mg (1.1 mmol) **79**  
                       2.) 2x0.6 mmol DHAP, 2x200 U RhuA (2d)  
                       3.) 500 U Pase (3d)

Ausbeute :        20 mg (5%) **85** als farbloser Feststoff  
                       und 20 mg (5%) **86** als farbloser Feststoff (1:1)

nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform : Methanol : Wasser = 50:10:1)



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):

$\delta$  = 7.16, 7.12 (2x s, 2H arom.), 6.17 (s, 10-H<sub>2</sub>), 5.60 (d, 6-H), 4.25 (t, 4-H), 4.13 (d, 3-H),  
 4.00 (dd, 5-H), 3.65 (d, 1a-H), 3.60 (d, 1b-H).

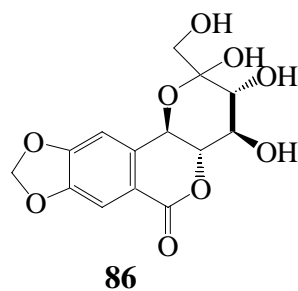
$J_{5-6} = 5.75$ ,  $J_{5-4} = 6.84$ ,  $J_{4-3} = 7.88$ ,  $J_{1a-1b} = 12.14$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):

$\delta$  = 175.59 (C-14), 157.00, 152.39 (C-9, -11), 147.07 (C-13), 121.18 (C-7),  
 106.50, 106.24 (C-8, C-12), 106.09 (C-10), 104.94 (C-2), 83.67 (C-6), 83.42 (C-5),  
 78.31 (C-3), 77.70 (C-4), 65.47 (C-1).

MS (ESI;  $m/z$  (%)): 349 (100)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_9$             326.26



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):

$\delta$  = 7.18, 7.13(2s, 2H arom.), 6.05 (s, 2H, 10-H), 5.24 (d, 6-H), 3.89 (t, 4-H), 3.74 (d, 1a-H), 3.71 (d, 3-H), 3.68 (t, 5-H), 3.54 (d, 1b-H).

$J_{5-6} = J_{\text{trans}} = 9.97$ ,  $J_{5-4} = 9.44$ ,  $J_{4-3} = 9.55$ ,  $J_{1a-1b} = 11.82$ .

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):

$\delta$  = 188.42 (C-14), 151.21, 150.50 (C-9, -11), 132.41, 118.55 (C-7, -13), 115.45, 111.38 (C-8, -12), 105.10 (C-10), 100.95 (C-2), 76.92 (C-5), 76.52 (C-4), 75.63 (C-6), 73.43 (C-3), 66.48 (C-1).

MS (ESI; m/z (%)): 349 (100)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_9$                       326.26

## 9. Literatur

- [1] Schoffers, E., Olebiowski, A., Johnson, C. R. »Enantioselective synthesis through enzymatic asymmetrization« *Tetrahedron* **1996**, 52, 3769-3826.
- [2] »Enzyme Nomenclature«; Academic Press, Inc., New York, **1992**.
- [3] Sheldon, R. A. »Chirotechnology: Industrial syntheses of optically active compounds«; Marcel Dekker, Inc., New York, **1993**.
- [4] Jones, J. B. »Enzymes in organic chemistry« *Tetrahedron* **1986**, 42, 3351-3403.
- [5] Wong, C.-H., Whitesides, G. M. »Enzymes in synthetic organic chemistry«; Elsevier Science, Oxford, **1994**; Vol. 12.
- [6] Roberts, S. M. »Preparative biotransformations« *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2000**, 611-633.
- [7] Faber, K. »Biotransformations in Organic Chemistry«; 4th; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2000**.
- [8] Drauz, K., Waldmann, H. »Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A Comprehensive Handbook«; VCH, Weinheim, **2002**.
- [9] Schulze, B., Wubbolts, M. G. »Biocatalysis for industrial production of fine chemicals« *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10, 609-615.
- [10] Old, R. W., Primrose, S. B. »Gentechnologie - Eine Einführung«; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1992**.
- [11] Ogston, A. G. »Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements« *Nature* **1948**, 162, 953.
- [12] Machajewski, T. D., Wong, C.-H. »Die katalysierte asymmetrische Aldolreaktion« *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1406-1430.
- [13] Walter, C. »Chemische und enzymatische C-C Verknüpfung in wäßrigem Medium« Dissertation, RWTH Aachen, **1996**.
- [14] Fessner, W.-D. In *Stereoselective Biocatalysis* (Ed: Patel, R. N.), Marcel Dekker, New York, **2000**, pp 239-265.
- [15] Horecker, B. L., Tsolas, O., Lai, C. Y. »Aldolases« In *The Enzymes*, Vol. VII, (Ed: Boyer, P. D.), Academic Press, New York, **1972**, pp 213-258.
- [16] Choi, K. H., Mazurkie, A. S., Morris, A. J., Utheza, D., Tolan, D. R., Allen, K. N. »Structure of a fructose-1,6-bis(phosphate) aldolase liganded to its natural substrate in a cleavage-defective mutant at 2.3 Å.« *Biochemistry* **1999**, 38, 12655-64.

- [17] Dalby, A., Dauter, Z., Littlechild, J. A. »Crystal structure of human muscle aldolase complexed with fructose 1,6-bisphosphate: mechanistic implications.« *Protein Sci.* **1999**, 8, 291-7.
- [18] Verlinde, C. L. M. J., Quigley, P. M. »Structure-based reevaluation of the mechanism of class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase« *J. Mol. Biol* **1999**, 5, 37-45.
- [19] Hall, D. R., Leonard, G. A., Reed, C. D., Watt, C. I., Berry, A., Hunter, W. N. »The crystal structure of *Escherichia coli* class II fructose-1, 6-bisphosphate aldolase in complex with phosphoglycolohydroxamate reveals details of mechanism and specificity.« *J. Mol. Biol* **1999**, 287, 383-94.
- [20] Fessner, W.-D., Schneider, A., Sinerius, G., Walter, C., Hixon, M., Schloss, J. V. »The mechanism of class II metal-dependant Aldolases« *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2366-2369.
- [21] Joerger, A. C., Gosse, C., Fessner, W. D., Schulz, G. E. »Catalytic action of fuculose 1-phosphate aldolase (class II) as derived from structure-directed mutagenesis.« *Biochemistry* **2000**, 39, 6033-41.
- [22] Alajarin, R., Garciajunceda, E., Wong, C. H. »A short enzymatic synthesis of L-glucose from dihydroxyacetone phosphate and L-glyceraldehyde« *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 4294-4295.
- [23] Jurczak, J., Pikul, S., Bauer, T. »(R)- and (S)-2,3-O-isopropylideneglyceraldehyde in stereoselective organic synthesis« *Tetrahedron* **1986**, 42, 447-488.
- [24] Gijzen, H. J. M., Qiao, L., Fitz, W., Wong, C. H. »Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of carbohydrates and carbohydrate mimetics« *Chem. Rev.* **1996**, 96, 443-473.
- [25] Bednarski, M. D., Simon, E. S., Bischofberger, N., Fessner, W.-D., Kim, M. J., Lees, W., Saito, T., Waldmann, H., Whitesides, G. M. »Rabbit muscle aldolase as a catalyst in organic synthesis« *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 627-35.
- [26] Bednarski, M. D., Waldmann, H., Whitesides, G. M. »Aldolase-catalyzed synthesis of complex C8 and C9 monosaccharides« *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5807-5810.
- [27] Poss, C. S., Schreiber, S. L. »Two-directional chain synthesis and terminus differentiation« *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 9-17.
- [28] Maier, M. »Group selective reactions« In *Organic Synthesis Highlights II* (Ed: Waldmann, H.), VCH Verlag, Weinheim, **1995**, pp 203-222.
- [29] Eyrisch, O., Fessner, W.-D. »Disaccharid-Mimetica durch enzymatische Tandem-Aldoladditionen« *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1738-1740.
- [30] Petersen, M. »Chemoenzymatische Synthesen nicht-natürlicher Kohlenhydrate« Dissertation, RWTH Aachen, **1997**.

- [31] Petersen, M., Zannetti, M. T., Fessner, W.-D. »Tandem asymmetric C-C bond formations by enzyme catalysis« *Top. Curr. Chem.* **1997**, 186, 87-117.
- [32] Fessner, W.-D., Walter, C. »"Künstliche Metabolismus" zur asymmetrischen Eintopfsynthese verzweigter Saccharide« *Angew. Chem.* 1992, 104, 643-645.
- [33] Wong, H. N. C. »Total syntheses of naturally occurring molecules possessing 1,7-dioxaspiro[4.4]nonane skeletons« *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1757-1765.
- [34] Shibata, K., Hiruma, K., Kanie, O., Wong, C.-H. »Synthesis of 1,1-linked galactosyl mannosides carrying a thiazine ring as mimetics of sialyl Lewis X antigen: investigation of the effect of carboxyl group orientation on P-selectin inhibition« *J. Org. Chem.* 2000, 65, 2393-2398.
- [35] Florio, R. D., Rizzacasa, M. A. »Synthesis of 2,2-disubstituted furanoid natural products: total synthesis of sphydrofuran« *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 8595-8598.
- [36] Malakiel, B. P., Schmid, W. »Total synthesis of sphydrofuran« *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, 12, 415-424.
- [37] Phung, A. N., Braun, J., LeGoffic, F. »Resolution of solketal by enzymatic hydrolysis of its decanoyl ester« *Synth. Commun.* **1995**, 25, 1783-1788.
- [38] Orru, R. V., Archelas, A., Furstoss, R., Faber, K. »Epoxide hydrolases and their synthetic applications.« *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1999**, 63, 145-67.
- [39] Griengl, H., Schwab, H., Fechter, M. »The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases.« *Trends Biotechnol.* **2000**, 18, 252-6.
- [40] Schmid, R. D., Verger, R. »Lipasen: Grenzflächen-Enzyme mit attraktiven Anwendungen« *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1694-1720.
- [41] Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norzkov, L., Thim, L., Menge, U. »A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase« *Nature* **1990**, 343, 767-770.
- [42] Winkler, F. K., D'Arcy, A., Hunziker, W. »Structure of human pancreatic lipase« *Nature* **1990**, 343, 771-774.
- [43] Almarson, Ö., Klibanov, A. M. »Remarkable activation of enzymes in nonaqueous media by denaturing organic cosolvents« *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, 49, 87-92.
- [44] Louwrier, A., Drtina, G. J., Klibanov, A. M. »On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media« *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, 50, 1-5.
- [45] Zaks, A., Klibanov, A. M. »The effect of water on enzyme action in organic media« *J. Biol. Chem.* **1998**, 263, 8017-8021.



- [46] Khmelnitsky, Y., Rich, J. O. »Biocatalysis in nonaqueous solvents« *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 47-53.
- [47] Carrea, G., Riva, S. »Enzyme in organischen Lösungsmitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese« *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2313-2341.
- [48] Berkowitz, D. B., Hartung, R. E., Choi, S. »Hydrolytic enzymatic transformation of advanced synthetic intermediates: on the choice of the organic cosolvent« *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, 10, 4513-4520.
- [49] Strauss, U. T., Felfer, U., Faber, K. »Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess« *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, 10, 107-110.
- [50] Chen, C.-S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C. J. »Quantitative Analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers« *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7294-7299.
- [51] Fersht, A. »Enzyme Structure and Mechanismus«; 2nd ed.; W. H. Freeman and Co., New York, **1985**.
- [52] Hoff, B. H., Ljones, L., Ronstad, A., Anthonsen, T. »Influence of substituents on enantiomeric ratio in transesterification of racemic C-3 synthons using lipase B from *Candida antarctica*« *J. Mol. Cat. B* **2000**, 8, 51-60.
- [53] Prelog, V. »Specifications of the stereospecificity of some oxidoreductions by diamond lattices sections« *Pure Appl. Chem.* **1964**, 9, 119-130.
- [54] Kazlauskas, R. J., Weissfloch, A. N. E., Rappaport, A. T., Cuccia, L. A. »A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalysed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*« *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2656-2665.
- [55] Weissfloch, A. N. E., Kazlauskas, R. J. »Enantiopreference of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols« *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 6959-6969.
- [56] Bevinakatti, H. S., Banerji, A. A. »Practical chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of propanolol« *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5372-5375.
- [57] Bevinakatti, H. S., Banerji, A. A. »Lipase catalysis in organic solvents. Application to the synthesis of (R)- and (S)-atenolol« *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6003-6005.
- [58] Barton, P., Page, M. »The resolution of racemic 1,2-diols by the esterase catalysed hydrolysis of the corresponding cyclic carbonate« *Tetrahedron* **1992**, 48, 7731-7734.
- [59] Matsumoto, K., Fuwa, S., Kitajima, H. »Enzyme-mediated enantioselective hydrolysis of cyclic carbonates« *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6499-6502.

- [60] Shimojo, M., Matsumoto, K., Hatanaka, M. »Enzyme-mediated preparation of optically active 1,2-diols bearing a long chain: Enantioselective hydrolysis of cyclic carbonates« *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9281-9288.
- [61] Matsumoto, K., Shimojo, M., Kitajima, H., Hatanaka, M. »Enzyme-catalyzed enantioselective hydrolysis of 6-membered cyclic carbonates using water-immiscible co-solvent system« *Synlett* **1996**, 1085-1086.
- [62] Matsumoto, K., Sato, Y., Shimojo, M., Hatanaka, M. »Highly enantioselective preparation of  $C_2$ -symmetrical diols: microbial hydrolysis of cyclic carbonates« *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11*, 1965-1973.
- [63] Nerdel, F., Rachel, H. »Die Synthese von Mandelsäure-Analogen: Über Styrolglykolsäuren« *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 671-677.
- [64] Faber, K., Riva, S. »Enzyme-catalyzed irreversible acyl transfer« *Synthesis* **1992**, *10*, 895-910.
- [65] Ghogare, A., Kumar, G. S. »Oxime esters as novel irreversible acyl transfer agents for lipase catalysis in organic media« *Chem. Commun.* **1989**, 1533-1535.
- [66] Ghogare, A., Kumar, G. S. »Novel route to chiral polymers involving biocatalytic transesterification of *O*-acryloyl oximes« *Chem. Commun.* **1990**, 134-135.
- [67] Bianchi, D., Cesti, P., Battistel, E. »Anhydrides as acylating agents in lipase-catalyzed stereoselective esterification of racemic alcohols« *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5531-5534.
- [68] Faber, K., Griengel, H. »Enzymatic acylation using acid anhydrides: crucial removal of acid« *Tetrahedron Asymmetry* **1990**, *1*, 541-546.
- [69] Wang, Y.-F., Lalonde, J. J., Momongan, M., Bergbreiter, D. E., Wong, C.-H. »Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective syntheses of alcohols, glycerol derivatives, sugars, and organometallics« *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7200-7205.
- [70] Kita, Y., Takebe, Y., Murata, e., Naka, T., Akai, S. »1-Ethoxyvinyl acetate as a novel, highly reactive, and reliable acyl donor for enzymatic resolution of alcohols« *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7369-7372.
- [71] Kita, Y., Takebe, Y., Murata, K., Naka, T., Akai, S. »Convenient enzymatic resolution of alcohols using highly reactive, nonharmful acyl donors, 1-ethoxyvinyl esters« *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 83-88.
- [72] Chen, C.-S., Liu, Y.-C. »A chemoenzymatic access to optically active 1,2-epoxides« *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 7165-7168.
- [73] Boaz, N. W., Zimmerman, R. L. »Amine assisted enzymatic esterification of 1,2-diol monoyosylates« *Tetrahedron Asymmetry* **1994**, *5*, 153-156.

- [74] Secundo, F., Oppizzi, M. L., Carrea, G., de Amici, M., Dallanocce, C. »Enzymatic resolution of 3-butene-1,2-diol in organic solvents and optimization of reaction conditions« *Biocatal. Biotransform.* **1999**, 17, 241-250.
- [75] Goergens, U., Schneider, M. P. »Enzymatic preparation of enantiomerically pure and selectively protected 1,2- and 1,3-diols« *Chem. Commun.* **1991**, 1066-1068.
- [76] Ziegler, T., Bien, F., Jurisch, C. »Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically pure alkene 1,2- diols and glycosides thereof« *Tetrahedron Asymmetry* **1998**, 9, 765-780.
- [77] Theil, F., Lemke, K., Ballshuh, S., Kunath, A., Shick, H. »Lipase-catalysed resolution of 3-(aryloxy)-1,2-propanediol derivatives towards an improved active site model of *Pseudomonas cepacia* lipase (Amano PS).« *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, 6, 1323-1344.
- [78] Kim, M.-J., Choi, Y. K. »Lipase catalyzed enantioselective transesterification of O-trityl 1,2-diols. Practical synthesis of (*R*)-tritylglycidol.« *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1605-1607.
- [79] Kim, M.-J., Lim, I. T., Choi, G.-B., Whang, S.-Y., Ku, B.-C., Choi, J.-Y. »The efficient resolution of protected diols and hydroxy aldehydes by lipases : steric auxiliary approach and synthetic applications« *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 71-76.
- [80] Theil, F., Weidmer, J., Ballschuh, S., Kunath, A., Schick, H. »Kinetic resolution of acyclic 1,2-diols using a sequential lipase-catalyzed transesterification in organic solvents« *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 388-393.
- [81] Ader, U., Schneider, M. P. »Enzyme assisted preparation of enantiomerically pure  $\beta$ -adrenergic blockers III. Optically active chlorohydrin derivatives and their conversion« *Tetrahedron Asymmetry* **1992**, 3, 521-524.
- [82] Arth, H.-L. »Synthesestudien zu DHAP-Analoga« Dissertation, RWTH Aachen, **1997**.
- [83] Fessner, W.-D., Petersen, M., Papadopoulos, M. A., Osswald, G., **1998**, »Chemoenzymic method for the production of oligosaccharides and their derivatives.«, PCT Int. Appl.
- [84] Yamamoto, Y., Asao, N. »Selective reactions using allylic metals« *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2207-2293.
- [85] Lubineau, A., Auge, J. »Water as solvent in organic synthesis« In *Modern Solvents in Organic Synthesis*, Vol. 206, (Ed: Springer-Verlag, Berlin, **1999**, pp 1-39.
- [86] Pétrier, C., Luche, J.-L. »Allylzinc reagent additions in aqueous media« *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 910-912.
- [87] Li, C.-J. »Aqueous Barbier-Grignard type reaction: scope, mechanism, and synthetic applications« *Tetrahedron* **1996**, 52, 5643-5668.

- [88] Kim, E., Gordon, D. M., Schmid, W., Whitesides, G. M. »Tin-Mediated and Indium-Mediated Allylation in Aqueous Media -Application to Unprotected Carbohydrates« *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5500-5507.
- [89] Meinwald, J., Crandall, J. K., Gassman, P. G. »The bicyclo[2.2.1]heptan-2,5-diols« *Tetrahedron* **1962**, 18, 815-820.
- [90] Kleinfelter, D. C., Schleyer, P. v. R. »2-Norbornane« In *Organic Syntheses*, Coll. Vol. 5, (Ed: Wiley, New York, **1973**, pp 852-855.
- [91] Hawkins, R. T., Hsu, R. S., Wood, S. G. »Bicyclo[2.2.1]heptan-2,5-dione: Its preparation and reaction with nucleophiles« *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 4648-4650.
- [92] Fessner, W.-D., Sinerius, G., Schneider, A., Dreyer, M., Schulz, G. E., Badia, J., Aguilar, J. »Diastereoselektive, enzymatische Aldoladditionen mit L-Rhamnulose- und L-Fuculose-1-phosphat-Aldolasen aus E. coli« *Angew. Chem.* **1991**, 103, 596-599.
- [93] Horan, J. E., Schiessler, R. W. »2-Indanone« In *Organic Synthesis*, Coll. Vol. V, (Ed: Wiley, New York, **1973**, pp 647-649.
- [94] Bors, D. A., Kaufman, M. J., Andrew Streitwieser, J. »Carbon acidity. 67. The indicator scale of cesium ion pairs in tetrahydrofuran« *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 6975-6982.
- [95] Brockamp, H. P., Kula, M. R. »Staphylococcus carnosus aldolase as catalyst for enzymic aldol reactions« *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 7123-6.
- [96] Saenger, W. »Cyclodextrin-Einschlußverbindungen in Forschung und Industrie« *Angew. Chem.* **1980**, 92, 343-361.
- [97] Zelinski, T., Kula, M.-R. »Asymmetric enzymatic reduction of lipophilic ketones in aqueous solution containing cyclodextrins« *Biocatal. Biotransform.* **1997**, 15, 57-74.
- [98] Zelinski, T., Liese, A., Wandrey, C., Kula, M.-R. »Asymmetric reductions in aqueous media: enzymatic synthesis in cyclodextrin containing buffers« *Tetrahedron Asymmetry* **1999**, 10, 1681-1687.
- [99] Dudziak, G., Bézay, N., Schwientek, T., Clausen, H., Kunz, H., Liese, A. »Cyclodextrin-assisted glycan chain extension on a protected glycosyl amino acid« *Tetrahedron* **2000**, 56, 5865-5869.
- [100] Solà, L., Vidal-Ferran, A., Moyano, A., Pericàs, M. A., Riera, A. »New indane derived aminoalcohol as chiral ligands for the catalytic enantioselective addition of diethylzinc to aldehydes.« *Tetrahedron Asymmetry* **1997**, 8, 1559-1568.
- [101] Lee, J., Choi, W.-B., Lynch, J. E., Volante, R. P., reider, P. J. »Practical synthesis of  $\alpha$ -amino acids using *cis*-aminoindanol derived hippuric acid amide as a glycine enolate equivalent.« *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 3679-3682.

- [102] Maligres, P. E., Upadhyay, V., Rossen, K., Cianciosi, S. J., Purick, R. M., Eng, K. K., Reamer, R. A., Askin, D., Volante, R. P., Reider, P. J. »Diastereoselective *syn*-epoxidation of 2-alkyl-4-enamides to epoxyamides : Synthesis of the Merck HIV-1 protease inhibitor epoxide intermediate.« *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2195-2198.
- [103] Choi, W.-B., Houpis, I. N., Churchill, H. R. O., Molina, A., Lynch, J. E., Volante, R. P., Reider, P. J., King, A. O. »A practical synthesis of the 5-chloromethyl-furo[2,3-b]pyridine pharmacophore« *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 4571-4574.
- [104] Rossen, K., Reamer, R. A., Volante, R. P., J., R. P. »Mechanistic studies on the diastereoselective halohydroxylation of  $\gamma$ - $\delta$  unsaturated carboxamides.« *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6843-6846.
- [105] Rossen, P., Pye, P. J., DiMichele, L. M., Volante, R. P., Reider, P. J. »An efficient asymmetric hydrogenation approach to the synthesis of the Crixivan<sup>®</sup> piperazine intermediate.« *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6823-6826.
- [106] Ito, S., Kasai, M., Ziffer, H., Silverton, J. V. »Preparation of chiral allylic alcohols using *Rhizopus nigricans*. Use of the Harada-Nakanishi exciton chirality method for verifying configurational assignments of allylic alcohols.« *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 574-582.
- [107] Takahashi, M., Koike, R., Ogasawara, K. »Lipase-mediated resolution of inden-1-ol« *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, 43, 1585-1587.
- [108] Lee, K., Resnick, S. M., Gibson, D. T. »Stereospecific oxidation of (*R*)- and (*S*)-1-indanol by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas sp.* strain NCIB 9816-4.« *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 2067-2070.
- [109] Nukina, M., Ito, S., Kurebayashi, T. »Microbial transformation of indene by the *Pyricularia zingiberi* Nishikado fungus.« *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, 60, 2097-2098.
- [110] Gibson, D. T., Resnick, S. M., Lee, K., Brand, J. M., Torok, D. S., Wackett, L. P., Schocken, M. J., Haigler, B. E. »Desaturation, dioxygenation, and monooxygenation reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas Sp* strain 9816-4.« *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 2615-2621.
- [111] Szmant, H. H., Mata, A. J., Namis, A. J., Panthananickal, A. M. »The thiol-olefin co-oxidation (TOCO) reaction—IV : temperature effects on products distribution in the TOCO reaction of indene and aromatics thiols« *Tetrahedron* **1976**, 32, 2665-2680.
- [112] Schuster, M., Blechert, S. »Die Olefinmetathese in der organischen Synthese« *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2124-2144.
- [113] Grubbs, R. H., Chang, S. »Recent advances in olefin metathesis and its application in organic synthesis« *Tetrahedron* **1998**, 54, 4413-4450.
- [114] Armstrong, S. K. »Ring closing diene metathesis in organic synthesis« *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1998**, 2, 371-388.

- [115] Fürstner, A. »Olefinmetathese und mehr« *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3140-3172.
- [116] Trnka, T. M., Grubbs, R. H. »The development of  $L_2X_2Ru=CHR$  olefin metathesis catalysts: an organometallic success story« *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18-29.
- [117] Schrock, R. R. »Olefin metathesis by well-defined complexes of molybdenum and tungsten« In *Topics in Organometallic Chemistry*, 1, (Ed: Fürstner, A.), Springer, Berlin, **1998**, pp 1-36.
- [118] Fürstner, A. »Alkene metathesis in organic synthesis« In *Topics in Organometallic Chemistry*, 1, (Ed: Fürstner, A.), Springer, Berlin, **1998**, pp 37-72.
- [119] Schrock, R. R., Murdzek, J. S., Bazan, G. C., Robbins, J., DiMare, M., O'Regan, M. »Synthesis of molybdenum imido alkylidene complexes and some reactions involving acyclic olefins« *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3875-3886.
- [120] Nguyen, S. T., Grubbs, R. H., Ziller, J. W. »Synthesis and activities of new single-component, ruthenium-based olefin metathesis catalysts« *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9858-9859.
- [121] Schwab, P., France, M. B., Ziller, J. W., Grubbs, R. H. »Eine Reihe definierter Metathesekatalysatoren — Synthese von und Reaktionen mit  $[RuCl_2(=CHR')(PR_3)_2]$ « *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2179-2181.
- [122] Couturier, J.-L., Paillet, C., Leconte, M., Basset, J.-M., Weiss, K. »Ein cyclometallierter Aryloxy(chloro)neopentylidenwolfram-Komplex, ein hochaktiver, stereoselektiver Katalysator für die Metathese von *cis*- und *trans*-2-Penten, Norbornen, 1-Methylnorbornen und Ölsäureethylester« *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 622-624.
- [123] Fujimura, O., Grubbs, R. H. »Asymmetric ring-closing metathesis : kinetic resolution catalyzed by a chiral molybdenum alkylidene complex« *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2499-2500.
- [124] Kirkland, T. A., Lynn, D. M., Grubbs, R. H. »Ring-closing metathesis in methanol and water« *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9904-9909.
- [125] Dias, E. L., Nguyen, S. T., Grubbs, R. H. »Well-defined ruthenium olefin metathesis catalysts : mechanism and activity« *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3887-3897.
- [126] Weskamp, T., Schattenmann, W. C., Spiegler, M., Herrmann, W. A. »Eine neue Generation von Rutheniumkatalysatoren für die Olefinmetathese« *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2631-2633.
- [127] Ackermann, L., Fürstner, A., Weskamp, T., Kohl, F. J., Herrmann, W. A. »Ruthenium carbene complexes with imidazolin-2-ylidene ligands allow the formation of tetrasubstituted cycloalkenes by RCM« *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4787-4790.
- [128] Scholl, M., Trnka, T. M., Morgan, J. P., Grubbs, R. H. »Increased ring closing metathesis activity of ruthenium-based olefin metathesis catalysts coordinated with imidazolin-2-ylidene ligands« *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2247-2250.

- [129] Chatterjee, A. K., Morgan, J. P., Scholl, M., Grubbs, R. H. »Synthesis of functionalized olefins by cross and ring-closing metatheses« *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3783-3784.
- [130] Hérrison, J.-L., Chauvin, Y. »Catalyse de transformation des oléfines par les complexes du tungstène« *Makromol. Chem.* **1970**, *141*, 161-176.
- [131] Maier, M. E. »Synthese von mittleren Ringen durch Ringschluß-Metathese-Reaktion« *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2153-2157.
- [132] Barrett, A. G. M., Baugh, S. P. D., Braddock, D. C., Flack, K., Gibson, V. C., Giles, M. R., Marshall, E. L., Procopiou, P. A., White, A. J. P., Williams, D. J. »Rapid entry into mono-, bi-, and tricyclic beta-lactam arrays via alkene metathesis« *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7893-7907.
- [133] Burke, S. D., Ng, R. A., Morrison, J. A., Alberti, M. J. »Tandem glycolate Claisen rearrangement/ring-closing metathesis: A stereochemically general synthesis of substituted dihydropyran-2-carboxylates« *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3160-3161.
- [134] White, J. D., Hrnčiar, P., Yokochi, A. F. T. »Tandem ring-closing metathesis transannular cyclization as a route to hydroxylated pyrrolizidines. Asymmetric synthesis of (+)-australine« *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7359-7360.
- [135] Roy, R., Das, S. K. »Recent applications of olefin metathesis and related reactions in carbohydrate chemistry« *Chem. Commun.* **2000**, 519-529.
- [136] Kingsbury, C. L., Mehrman, S. J., Takacs, J. M. »A comprehensive review of the applications of transition metal-catalyzed reactions to solid-phase synthesis« *Curr. Org. Chem.* **2000**, *3*, 497-555.
- [137] Boger, D. L., Chai, W. Y. »Solution-phase combinatorial synthesis: Convergent multiplication of diversity via the olefin metathesis reaction« *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3955-3970.
- [138] Crimmins, M. T., King, B. W. »An efficient asymmetric approach to carbocyclic nucleosides: asymmetric synthesis of 1592U89, a potent inhibitor of HIV reverse transcriptase« *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4192-4193.
- [139] Ovaa, H., Codée, J. D. C., Lastdrager, B., Overkleeft, H. S., Marel, G. A. v. d., Boom, J. H. v. »A stereoselective and efficient route to (3*S*,4*R*,5*S*)-(+)-4,5-dihydroxycyclopent-1-en-3-ylamine: the side chain of the hypermodified nucleoside Q« *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7987-7990.
- [140] Ovaa, H., Codée, J. D. C., Lastdrager, B., Overkleeft, H. S., Marel, G. A. v. d., Boom, J. H. v. »A versatile approach to the synthesis of highly functionalised carbocycles« *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5063-5066.
- [141] Holt, D. J., Barker, W. D., Jenkins, P. R., Davies, D. L., Garratt, S., Fawcett, J., Russell, D. R., Ghosh, S. »Ringschlußmetathese bei der Anellierung von Kohlenhydraten« *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3486-3487.

- [142] Holt, D. J., Barker, W. D., Jenkins, P. R. »Stereoselective preparation of enantiomerically pure annulated carbohydrates using ring-closing metathesis« *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 482-493.
- [143] Hartman, G. D., Halczenko, W., Philips, B. T. »Iminium ion mediated cyclizations of 4-aryl-1,4-dihydropyridines bridging with olefins« *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2427-2431.
- [144] Maynard, H. D., Grubbs, R. H. »Purification technique for the removal of ruthenium from olefin metathesis reaction products« *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4137-4140.
- [145] Ellis, J. W., Harrison, K. N., Hoyer, P. A. T., Orpen, A. G., Pringle, P. G., Smith, M. B. »Water-soluble tris(hydroxymethyl)phosphine complexes with nickel, palladium and platinum. Crystal structure of [Pd{P(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>}<sub>4</sub>]•CH<sub>3</sub>OH.« *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 3026-3033.
- [146] Paquette, L. A., Schloss, J. D., Efremov, I., Fabris, F., Gallou, F., Méndez-Andino, J., Yang, J. »A convenient method for removing all highly-colored byproducts generated during olefin metathesis reactions« *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1259-1261.
- [147] Jeffrey, A. M., Jerina, D. M. »Autooxidation of 1,4-dihydronaphthalene. Formation of 3-benzoxepin *via* pyrolysis of 1,2-dihydronaphthalene 2-hydroperoxide.« *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4048-4049.
- [148] Brown, H. C., Vara Prasad, J. V. N. »Hydroboration. 72. Hydroboration-oxidation of 1,4-epoxy-1,4-dihydronaphthalene with and without ring opening.« *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3002-3005.
- [149] Boyd, D. R., Sharma, N. D., Kerley, N. A., McMordie, R. A. S., Sheldrake, G. N., Williams, P., Dalton, H. »Dioxygenase-catalysed oxidation of dihydronaphthalenes to yield arene hydrate and *cis*-dihydronaphthalenediols.« *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1996**, 67-74.
- [150] Clark, J. S., Kettle, J. G. »Enantioselective synthesis of medium-ring sub-units of brevetoxin A by ring-closing metathesis« *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 127-130.
- [151] Tschamber, T., Backenstrass, F., Fritz, H., Streith, J. »Catalytic one-pot osmylation of cyclohexadienes: stereochemical and conformational studies of the resulting polyols« *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 1052-1060.
- [152] Maras, A., Seçen, H., Sütbeyaz, Y., Balci, M. »A convenient synthesis of (±)-*talo*-quercitol (1-deoxy-*neo*-inositol) and (±)-*vibo*-quercitol (1-deoxy-*myo*-inositol) *via* ene reaction of singlet oxygen« *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2039-2041.
- [153] O'Brien, P., Poumellec, P. »Chiral lithium amide base-mediated rearrangement of bis-protected *meso*-4,5-dihydroxycyclohexene oxides : Enantioselective synthesis of (4*R*,5*S*)- and (4*S*,5*R*)-4,5-bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)cyclohex-2-enone« *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1998**, *15*, 2435-2442.



- [154] Brunel, Y., Rousseau, G. »Preparation of oxepanes, oxepenes, and oxocanes by iodoetherification using bis(sym-collidine)iodine (I) hexafluorophosphate as electrophile« *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5793-5800.
- [155] Krow, G. R., Carmosin, R., Mancuso, A. *Org. Prep. Proceed. Int.* **1977**, *9*, 285-286.
- [156] Hüchel, W., Wörffel, U. »Reduktionen in flüssigem Ammoniak VII: Hexahydronaphthalin« *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 2998-2102.
- [157] Oßwald, G. M. »Aspekte wäßriger Allylierungsreaktionen zur Synthese von Aldosesubstraten« Diplomarbeit, Universität Freiburg im Breisgau, **1996**.
- [158] Méndez-Andino, J., Paquette, L. A. »Tandem deployment of indium-, ruthenium-, and lead-promoted reactions. Four-carbon intercalation between the carbonyl groups of open-chain and cyclic  $\alpha$ -diketones.« *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1263-1265.
- [159] James, W. O. »Alkaloids in the plants« In *The Alkaloids*, I, (Ed: Manske, R. H. F.), Academic Press, New York, **1950**, pp 15-90.
- [160] Martin, S. F. »The Amaryllidaceae alkaloids« In *The Alkaloids*, XXX, (Ed: Brossi, A.), Academic Press, New York, **1987**, pp 251-376.
- [161] Sulffness, M., Cordell, G. A. »Antitumor alkaloids : Amaryllidaceae alkaloids« In *The Alkaloids*, XXV, (Ed: Brossi, A.), Academic Press, New York, **1985**, pp 198-212.
- [162] Pettit, G. R., Gaddamidi, V., Cragg, G. M., Herald, D. L., Sagawa, Y. »Isolation and structure of pancratistatin« *Chem. Commun.* **1984**, 1693-1694.
- [163] Pettit, G. R., Pettit, G. R. d., Backhaus, R. A., Boyd, M. R., Meerow, A. W. »Antineoplastic agents, 256. Cell growth inhibitory isocarbostryls from *Hymenocallis*« *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1682-7.
- [164] Gabrielsen, B., Monath, T. P., Huggins, J. W., Kefauver, D. F., Pettit, G. R., Groszek, G., Hollingshead, M., Kirsi, J. J., Shannon, W. M., Schubert, E. M., al, e. »Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances« *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1569-81.
- [165] Okamoto, T., Torii, Y., Isogai, Y. »Lycoricidinol and lycoricidine, new plant-growth regulators in the bulbs of *Lycoris radiata* herb.« *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, *16*, 1860-1864.
- [166] Carrasco, L., Fresno, M., vazquez, D. »Narciclasine : an antitumor alkaloid which blocks peptide bond formation by eukaryotic ribosomes« *FEBS Lett.* **1975**, *52*, 236-239.
- [167] Jimenez, A., Sanchez, L., Vazquez, D. »Location of resistance to the alkaloid narciclasine in the 60s ribosomal unit« *FEBS Lett.* **1975**, *55*, 53-56.
- [168] Jimenez, A., Santos, A., alonso, G., Vasquez, D. »Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells. Comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids« *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *425*, 342-348.

- [169] Mikami, M., Kitano, M. K., Ariki, Y., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yamazaki, M., Yui, S. »Suppressive activity of lycoricidinol (narciclasine) against cytotoxicity of neutrophil-derived calprotectin, and its suppressive effect on rat adjuvant arthritis model« *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, 22, 674-678.
- [170] Chrétien, F., Ahmed, S. I., Masion, A., Chapleur, Y. »Enantiospecific synthesis and biological evaluation of *seco*-analogues of antitumor Amaryllidaceae alkaloids.« *Tetrahedron* **1993**, 49, 7463-7478.
- [171] Pettit, G. R., Pettit III, G. R., Backhaus, R. A., Boettner, F. E. »Antineoplastic agents 294. Variations in the formation of pancratistatin and related isocarbostryls in *Hymenocallis littoralis*« *J. Nat. Prod.* **1995**, 58, 37-43.
- [172] Rigby, J., Mateo, M. »Total synthesis of (+)-narciclasine« *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12655-12656.
- [173] Danishefsky, S., Lee, J. Y. »Total synthesis of (±)-pancratistatin« *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4829-4837.
- [174] Trost, B. M., Pulley, S. R. »Asymmetric total synthesis of (+)-pancratistatin« *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 10143-10144.
- [175] Tian, X., Hudlicky, T., Königsberger, K. »First enantioselective total synthesis of (+)-pancratistatin : an unusual set of problems« *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3643-3644.
- [176] Hudlicky, T., Tian, X., Königsberger, K., Maurya, R., Rouden, J., Fan, B. »Toluene dioxygenase-mediated *cis*-dihydroxylation of aromatics in enantioselective synthesis. asymmetric total syntheses of pancratistatin and 7-deoxypancratistatin, promising antitumor agents.« *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10752-10765.
- [177] Zannetti, M. T., Fessner, W.-D., **1996**, unveröffentlichte Ergebnisse
- [178] Gibson, D. T., Subramaniam, V. In *Microbial degradation of organic compounds* (Ed: Gibson, D. T.), Marcel Dekker, New York, **1984**, pp 181.
- [179] Clark, J. H., Holland, H. L., Miller, J. M. »Hydrogen bonding in organic synthesis IV : a simple, high-yield method for the methylenation of catechols« *Tetrahedron Lett.* **1976**, 3361-3364.
- [180] Zelle, R. E., McClellan, W. J. »A simple, high-yield method for the methylenation of catechols« *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 2461-2464.
- [181] Fessner, W.-D., Eyrich, O. »Eintopfsynthese von Tagatose-1,6-bisphosphat durch diastereoselective enzymatische Aldoladdition« *Angew. Chem.* **1992**, 104, 76-78.
- [182] Eyrich, O., Sinerius, G., Fessner, W.-D. »Facile enzymic de novo synthesis and NMR spectroscopic characterization of D-tagatose-1,6-bisphosphate« *Carbohydr. Res.* **1993**, 238, 287-306.

- [183] Garcia-Junceda, E., Shen, G.-J., Sugai, T., Wong, C.-H. »A new strategy for the cloning, overexpression and one step purification of the three DHAP-dependent aldolases: rhamnulose-1-phosphate aldolase, fucose-1-phosphate aldolase and tagatose-1,6-diphosphate aldolase« *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 945-953.
- [184] Keck, G. E., Boden, E., Sonnewald, U. »Synthetic studies on lycoricidine. II. An efficient route to *cis*-dihydrolycoricidine.« *Tetrahedron Lett.* **1991**, 22, 2615-2618.
- [185] Bernabé, P., Castedo, L., Domínguez, D. »Intramolecular Diels-Alder reaction of 1-aminoisobenzofurans : application to the synthesis of benzo[c]phenanthridines.« *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9785-9788.
- [186] Conrad, P. C., Kwiatkowski, P. L., Fuchs, P. L. »Rapid access to a series of highly functionalized  $\alpha,\beta$ -unsaturated cyclopentenones. A caveat on aminospicyclization.« *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 586-591.
- [187] Harrowven, D. C., Newman, N. A., Knight, C. A. »On the identity of a neo-lignan from the fruits of *Viola Sebifera*.« *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6757-6760.
- [188] Clark, R. D., Jahangir »Synthetic studies on the lithited toluamide-imine cycloaddition route to ( $\pm$ )-corydalic acid methyl ester.« *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 1174-1178.
- [189] Demirjian, D. C., Shah, P. C., Varas, F. M. »Screening for novel enzymes« *Top. Curr. Chem.* **1999**, 200, 1-29.
- [190] Reetz, M. T., Jaeger, K.-E. »Superior biocatalysts by directed evolution« *Top. Curr. Chem.* **1999**, 200, 31-57.
- [191] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. »Molecular Cloning«; ed. 2; Cold Spring Harbor Laboratory Press., **1989**.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Nga PHUNG  
Geburtsdatum/-ort: 2. Feb. 1970, Fontenay-aux-Roses (Frankreich)  
Anschrift: Am Lainbach 23, 82431 Kochel am See  
Staatsangehörigkeit: französisch  
Familienstand: ledig

## Studium

09.88 - 06.90 "Classes préparatoires scientifiques", Paris  
naturwissenschaftliches Grundstudium

06.90 - "Concours d'entrée aux Grandes Ecoles"  
-Abschluß DEUG A, Universität von Paris VII  
naturwissenschaftliches Vordiplom

09.90 - 06.93 "Ecole Européenne des Hautes Etudes des  
Industries Chimiques de Strasbourg", EHICS (seit 1998 ECPM)  
06.93 Abschluß **Diplôme d'Ingénieur Chimiste EHICS**

09.93 - 09.94 Diplomstudium in Chemie, Universität von Paris VI  
Diplomarbeit unter Leitung von Prof. F. Le Goffic  
*Racematspaltung von Isopropylidenglycerin  
durch enzymatische Hydrolyse*  
am Institut für Bioorganische Chemie und Biotechnologie,  
09.94 Abschluß **Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA)**

06.96 - 03.01 Promotionstudium Chemie  
Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. W.-D. Fessner  
*Chemo-enzymatische asymmetrische Synthesen mit DHAP-Aldolasen*  
am Institut für Organische Chemie, RWTH Aachen, TU Darmstadt

## Berufliche Tätigkeiten

10.94 - 01.95 Institut für Bioorganische Chemie und Biotechnologie, Paris  
wissenschaftliche Hilfskraft

06.96 - 03.01 Institut für Organische Chemie, RWTH Aachen und TU Darmstadt  
wissenschaftliche Angestellte

04.01 - 03.03 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg  
Post-Doc

## Veröffentlichungen

»Resolution of Solketal by Enzymatic Hydrolysis of its Decanoyl Ester«  
N. Phung, J. Braun and F. Le Goffic, *Synth. Commun.*, **1995**, 25, 1783-1788

»Synthesis of (difluoromethyl)phosphonate azasugars designed as inhibitors for glycosyl transferases«  
J.-B. Behr, C. M. Evina, N. Phung and G. Guillermin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 1597-1599

»Diastereoselective free-radical synthesis of  $\alpha$ -substituted C-glycosyl phosphonates, and their use as building blocks in the HWE-reaction«  
H.-D. Junker, N. Phung and W.-D. Fessner, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 7063-7066

»Stereospecific biocatalytic synthesis of pancratistatin analogues«  
N. Phung, M. T. Zannetti, G. Whited and W.-D. Fessner *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 39, 4970-4972